

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyziologie



*Cirkadiánní systém laboratorního potkana během
ontogeneze*

Circadian System of Laboratory Rat During Ontogenesis

Bc. Lucie Olejníková

Praha 2013

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Alena Sumová, DSc.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně, pouze s použitím uvedené literatury. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 5.5. 2013

Lucie Olejníková

Ráda bych poděkovala PharmDr. Aleně Sumové, DSc. za vedení mé práce a odbornou pomoc. Poděkování patří také celému kolektivu oddělení Neurohumorálních regulací FGÚ AV ČR za jejich cenné rady a pomoc při práci.

ABSTRAKT

Jednou z vlastností společných téměř všem živým organismům je schopnost vytvářet a udržovat endogenní rytmy, které jsou řízeny biologickými hodinami. Rytmy opakující se v neperiodickém prostředí s periodou přibližně 24 hodin nazýváme rytmy cirkadiánní. Mezi cirkadiánní rytmy patří např. rytmus ve spánku a bdění, v pohybové aktivitě, tělesné teplotě a sekreci hormonů. U savců se cirkadiánní systém skládá z centrálního oscilátoru, který je uložen v suprachiasmatických jádrech (SCN) hypothalamu, a dalších oscilátorů v různých částech mozku, periferních orgánech a tkáních. Ontogenetický vývoj cirkadiánního systému probíhá postupně a prodělává největší změny během pozdně embryonálního a raně postnatálního vývoje. Cirkadiánní hodiny jsou v přirozených podmínkách seřizovány k 24 hodinovému cyklu především střídáním světla a tmy. V podmínkách, kdy je pravidelné střídání světla a tmy narušeno, a také během ontogenetického vývoje, se však uplatňují i jiné vlivy, umožňující synchronizaci centrálních hodin v SCN. Všechny mechanismy této synchronizace nejsou ještě plně známy, ale zahrnují nejrozličnější behaviorální, hormonální i metabolické signály. Cílem této diplomové práce bylo sledovat synchronizaci mláďat potkana mateřskými vlivy v průběhu časně ontogeneze a srovnat vývoj rytmické exprese vybraných hodinových genů u dvou modelových kmenů potkana – Wistar a SHR.

Klíčová slova: ontogeneze, cirkadiánní rytmy, suprachiasmatická jádra, hodinové geny

ABSTRACT

One of the attributes common to almost all living organisms is an ability to generate and maintain endogenous rhythms, which are driven by the biological clock. The rhythms, which recur under constant conditions with a period of about 24 hours, are known as the circadian rhythms. The circadian rhythms include e.g. rhythms in sleep/wake, locomotor activity, body temperature and hormonal secretion. In mammals, the circadian system consists of the central oscillator in the suprachiasmatic nuclei (SCN) of the hypothalamus and other oscillators that reside in various brain areas as well as in numerous peripheral organs and tissues. Ontogenetic development of the circadian system proceeds gradually. The circadian system undergoes the most dramatic changes during the late embryonic and early postnatal period. Under natural conditions, the circadian clocks are precisely entrained to the 24 hour period by regular changes of the light and dark cycle. Under conditions when the periodic light-dark rhythm is disrupted as well as during the early ontogenesis, other mechanisms can be involved in the entrainment of the central clock in the SCN. All mechanisms of the entrainment are not fully known yet, but they involve plenty of behavioral, hormonal and metabolic signals. The aim of this thesis was to study the entrainment of rat pups by maternal influences during the early ontogenesis and to compare the development of rhythmic clock gene expression in two model rat strains – Wistar and SHR.

Keywords: ontogenesis, circadian rhythms, suprachiasmatic nuclei, clock genes

Obsah

1.	ÚVOD	10
2.	LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	11
2.1	BIOLOGICKÉ RYTMY	11
2.2	CIRKADIÁNNÍ RYTMY.....	11
2.3	CIRKADIÁNNÍ SYSTÉM U SAVCŮ, JEHO STRUKTURA A FUNKCE	12
2.3.1	SUPRACHISMATICKÁ JÁDRA	12
2.3.2	DALŠÍ OSCILÁTORY	15
2.4	MOLEKULÁRNÍ PODSTATA CIRKADIÁNNÍCH RYTMŮ	15
2.5	SYNCHRONIZACE SCN	17
2.5.1	SYNCHRONIZACE SVĚTLEM	17
2.5.2	NESVĚTELNÁ SYNCHRONIZACE	18
2.6	SYNCHRONIZACE PERIFERNÍCH ORGÁNŮ	19
2.7	ONTOGENETICKÝ VÝVOJ CIRKADIÁNNÍCH HODIN V SCN	21
2.8	SYNCHRONIZACE CENTRÁLNÍCH HODIN BĚHEM ONTOGENEZE	23
3.	CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE	27
4.	MATERIÁL A METODIKA	28
4.1	EXPERIMENTÁLNÍ ZVÍŘATA	28
4.2	USPOŘÁDÁNÍ EXPERIMENTŮ	28
4.2.1	EXPERIMENT 1:	28
4.2.2	EXPERIMENT 2:	29
4.2.3	EXPERIMENT 3:	30
4.2.4	EXPERIMENT 4:	30
4.3	SLEDOVÁNÍ POHYBOVÉ AKTIVITY	31
4.4	STANOVENÍ EXPRESE VYBRANÝCH HODINOVÝCH GENŮ PROSTŘEDNICTVÍM IN SITU HYBRIDIZACE.....	31
4.4.1	MATERIÁL A VYBAVENÍ	31
4.4.2	PŘÍPRAVA TKÁŇOVÝCH ŘEZŮ	34
4.4.3	PŘÍPRAVA ZNAČENÉ cDNA PRÓBY	34
4.4.4	PREHYBRIDIZACE	36
4.4.5	HYBRIDIZACE	37
4.4.6	POST-HYBRIDIZAČNÍ ODMYTÍ NENAVÁZANÉ PRÓBY	38
4.4.7	ANALÝZA HYBRIDIZAČNÍHO SIGNÁLU	40
5.	STATISTICKÁ ANALÝZA.....	42
6.	VÝSLEDKY	43
6.1	VLIV PRENATÁLNÍHO NASTAVENÍ HODIN V SCN NA JEJICH VÝVOJ BĚHEM ČASNÉHO POSTNATÁLNÍHO OBDOBÍ.....	43
6.1.1	Per1 mRNA	43
6.1.2	Per2 mRNA	43
6.1.3	Bmal1 mRNA	43
6.1.4	Rev-erb α mRNA	44
6.2	VLIV STÁLÉHO SVĚTLA A ZMĚNY REŽIMU V PŘÍJMU POTRAVY MATKY NA VÝVOJ RYTMICKÉ EXPRESE VYBRANÝCH HODINOVÝCH GENŮ V SCN JEJICH MLÁDAT	50
6.2.1	VLIV LL a OMEZENÍ DOBY PŘÍJMU POTRAVY MATEK NA CIRKADIÁNNÍ PROFIL HODINOVÝCH GENŮ V SCN MLÁDAT V P10	50

6.2.2	VLIV LL a OMEZENÍ DOBY PŘÍJMU POTRAVY MATEK NA CIRKADIÁNNÍ PROFIL HODINOVÝCH GENŮ V SCN U MLÁĐAT V P20.....	55
6.2.3	VLIV LL A OMEZENÍ DOBY PŘÍJMU POTRAVY MATEK NA RYTMUS V POHYBOVÉ AKTIVITĚ MLÁĐAT.....	59
6.3	VÝVOJ DENNÍCH PROFILŮ EXPRESE VYBRANÝCH HODINOVÝCH GENŮ V SCN U MLÁĐAT POTKANA KMENE SHR.....	64
6.3.1	Per1 mRNA.....	64
6.3.2	Per2 mRNA.....	64
6.3.3	Bmal1 mRNA.....	65
6.3.4	Rev-erb α mRNA.....	65
6.4	SROVNÁNÍ VLIVU ZMĚNY REŽIMU V PŘÍJMU POTRAVY U MATKY NA VÝVOJ RYTMICKÉ EXPRESE VYBRANÝCH HODINOVÝCH GENŮ V SCN U MLÁĐAT POTKANŮ KMENE WISTAR A SHR.....	72
6.4.1	VLIV VYSTAVENÍ MATEK ZMĚNĚ REŽIMU V PŘÍJMU POTRAVY NA VÝVOJ RYTMICKÉ EXPRESE VYBRANÝCH HODINOVÝCH GENŮ V SCN MLÁĐAT POTKANŮ KMENE SHR VE VĚKU P1.....	72
6.4.2	VLIV VYSTAVENÍ MATEK ZMĚNĚ REŽIMU V PŘÍJMU POTRAVY NA VÝVOJ RYTMICKÉ EXPRESE VYBRANÝCH HODINOVÝCH GENŮ V SCN MLÁĐAT POTKANŮ KMENE SHR VE VĚKU P10.....	77
6.4.3	VLIV VYSTAVENÍ MATEK ZMĚNĚ REŽIMU V PŘÍJMU POTRAVY NA VÝVOJ RYTMICKÉ EXPRESE VYBRANÝCH HODINOVÝCH GENŮ V SCN MLÁĐAT POTKANŮ KMENE WISTAR VE VĚKU P10.....	82
6.4.4	SROVNÁNÍ VLIVU VYSTAVENÍ MATEK ZMĚNĚ REŽIMU V PŘÍJMU POTRAVY NA VÝVOJ RYTMICKÉ EXPRESE VYBRANÝCH HODINOVÝCH GENŮ V SCN MLÁĐAT POTKANŮ VE VĚKU P10 MEZI KMENY WISTAR A SHR.....	87
7.	DISKUZE	92
7.1	VLIV PRENATÁLNÍHO NASTAVENÍ HODIN V SCN NA JEJICH VÝVOJ BĚHEM ČASNÉHO POSTNATÁLNÍHO OBDOBÍ.....	92
7.2	VLIV LL a OMEZENÍ DOBY PŘÍJMU POTRAVY MATEK NA CIRKADIÁNNÍ PROFIL VYBRANÝCH HODINOVÝCH GENŮ V SCN U MLÁĐAT VE VĚKU P10 A P20	94
7.3	VÝVOJ DENNÍCH PROFILŮ EXPRESE VYBRANÝCH HODINOVÝCH GENŮ V SCN U MLÁĐAT POTKANA KMENE SHR.....	97
7.4	VLIV VYSTAVENÍ MATEK ZMĚNĚ REŽIMU V PŘÍJMU POTRAVY NA VÝVOJ RYTMICKÉ EXPRESE VYBRANÝCH HODINOVÝCH GENŮ V SCN MLÁĐAT POTKANŮ KMENE WISTAR A SHR	99
8.	ZÁVĚR	101

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AMPA	α -amino-3hydroxy-5methyl-4-isoxazolepropionová kyselina
AVP	arginin vasopresin
Bmal1	brain and muscle Amt-like protein 1
BSA	bovine serum albumin, hovězí sérový albumin
CAMS	circadian activity monitoring system, systém monitorující cirkadiánní aktivitu (INSERM, Francie)
CaMK	calcium/calmodulin- dependent protein kinase
CK1 ϵ	kasein kináza1 ϵ
Clock	Circadian locomotor output cycles kaput
CREB	calcium/cAMP response element binding protein
CREs	calcium/cAMP response elements
Cry1,2	Cryptochrom
CT	circadian time, cirkadiánní čas
c-Fos	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog
DD	dark-dark, stálá tma
DEPC	diethylpyrokarbonát
dmSCN	dorsomedial suprachiasmatic nuclues, dorsomediální část suprachiasmatických jader
DTT	dithiotreitol
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid, ethylendiamintetraoctová kyselina
ETOH	ethanol
GABA	γ -aminomáselná kyselina
GHT	genikulohypotalamický trakt
GRP	gastrin-releasing peptid
HP	hybridizační pufr
ipRGC	intrinsically photosensitive retinal ganglion cells,
LD	light-dark, režim světlo-tma
LL	light-light, stálé světlo
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MT1,2	melatoninový receptor 1,2

NMDA	N-methyl-D-aspartát
OD	optická denzita
PACAP	pituitary adenylate cyclase-activating polypeptid
PAC1	receptor pro vasoaktivní intestinální peptid
PBS	phosphate buffered saline, fosfátový pufr
Per1,2	Period 1,2
PHI	histidin-isoleucin peptid
PKA	protein kináza A
RF	restricted feeding, omezený příjem potravy
RHT	retinohypotalamický trakt
Rora	RAR-related orphan receptor A
SCN	suprachiasmatické jádro
SDS	sodium dodecyl sulphate, dodecylsírán sodný
SHR	spontaneously hypertensiv rat, spontánně hypertenzní potkan
TCA	trichloroctová kyselina
TEA	triethanolamonium
TRIS	tri(hydroxymetyl)aminoetan
VIP	vasoaktivní intestinální peptid
vISCN	ventrolateral suprachiasmatic nucleus, ventrolaterální část suprachiasmatických jader
VPAC1,2	receptor pro vasoaktivní intestinální peptid 1,2

1. ÚVOD

Většina živých organismů na Zemi je vystavována periodicky se měnícím podmínkám, způsobeným jednak střídáním dne a noci, ale také ročních období. Proto jsou tyto živé organismy vybaveny vnitřním časovým systémem, který jim umožňuje se těmto měnícím se podmínkám lépe přizpůsobit. Součástí tohoto vnitřního časového systému jsou endogenní hodiny, které běží s přibližně denní periodou, a proto se nazývají cirkadiánní hodiny (z latinského „*circa diem*“, přibližně jeden den). Se solárním dnem, který trvá přesně 24 hodin, jsou pravidelně seřizovány pomocí vnějších synchronizátorů, kterými jsou především střídání světla a tmy a některé nesvětelné podněty. Cirkadiánní systém savců se skládá z centrálního pacemakeru, uloženého v suprachiasmatických jádrech hypotalamu, a dalších oscilátorů, které se nacházejí jak v jiných částech mozku, tak i v periferních orgánech a tkáních. Cirkadiánní rytmy běží i v neperiodickém prostředí, jsou tedy endogenní funkcí organismů. Na molekulární úrovni jsou založeny na rytmické expresi tzv. hodinových genů a jejich vzájemných transkripčně-translačních zpětnovazebných smyčkách. Tento systém se vyvíjí postupně během ontogeneze a největší změny prodělává během pozdní embryonální a raně postnatální fáze života. Ontogenezi cirkadiánních rytmů a jejich synchronizaci je v současné době věnovaná velká pozornost. Je známo, že během prenatálního a časného postnatálního vývoje plody a mláďata získávají informace o vnějším světě od matky. Není však doposud přesně znám mechanismus přenosu těchto informací.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 BIOLOGICKÉ RYTMY

Většina behaviorálních i fyziologických pochodů v organismu vykazuje rytmické změny. Tyto pochody se pravidelně opakují s určitou periodou a podle délky periody je rozdělujeme na:

- **ultradiánní** s periodou výrazně kratší než 24 hodin, např. srdeční a dechové rytmy
- **cirkadiánní**, mající periodu, která se blíží 24 hodinám, např. rytmus spánku a bdění u člověka, pohybové aktivity u zvířat, příjmu potravy, tělesné teploty, produkce hormonů či exprese mnohých genů
- **infradiánní** s periodou výrazně delší než 1 den, např. estrální cykly u zvířat, nebo roční rytmy v reprodukční aktivitě či v zimním spánku

2.2 CIRKADIÁNNÍ RYTMY

Pro cirkadiánní rytmy je charakteristické, že jsou to rytmy endogenní, tj. přetrvávající i za konstantních podmínek v neperiodickém prostředí, např. za podmínek stálé tmy bez informace o vnějším čase. V takových podmínkách tzv. „volně běží v čase“ (Hastings, 1997). Z toho vyplývá, že musí být poháněny nějakými vnitřními hodinami čili pacemakerem, který je schopen tvořit a udržovat oscilace. Endogenní perioda tohoto pacemakeru se označuje jako τ (tau) a měří se pomocí výstupních rytmů (např. spánek/bdění) v konstantních podmínkách, nejčastěji ve stálé tmě (Illnerová, 1994). Je třeba zdůraznit, že ne všechny periodicky se opakující děje v organismu jsou řízeny biologickými hodinami.

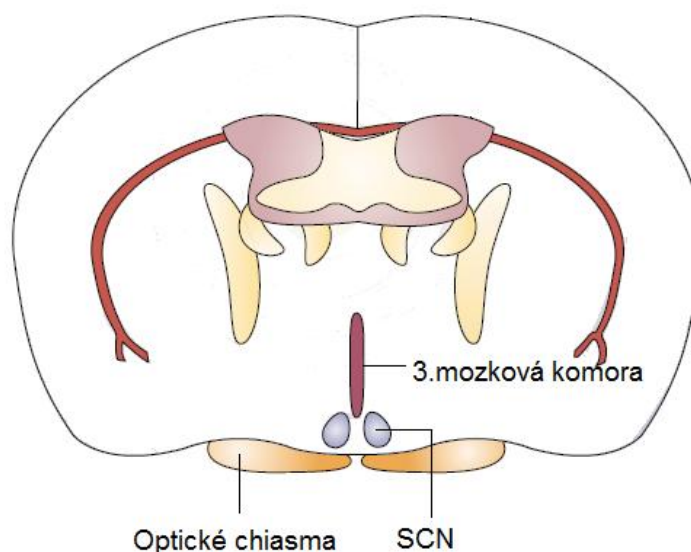
Cirkadiánní hodiny jsou přítomny téměř u všech organismů citlivých na světlo, od cyanobakterií po člověka (shrnutí v práci Schibler, 2005). Tyto hodiny běží s periodou přibližně 24 hodin, a to v rozmezí s $\tau = 20 - 28$ hod. Její délka je poměrně přesně dána druhově, např. u myši trvá průměrně 23,4 hod, u potkana 24,5 hod a u člověka mezi 24,2 – 25 hod.

2.3 CIRKADIÁNNÍ SYSTÉM U SAVCŮ, JEHO STRUKTURA A FUNKCE

Centrální pacemaker cirkadiánního systému u savců se nachází v suprachiasmatických jádrech (SCN) hypotalamu (Ralph a kol., 1990). Další, tzv. periferní oscilátory, jsou umístěny v jiných oblastech mozku a v různých orgánech a tkáních těla (Abe a kol., 2001; Balsalobre, 2002; Schibler a Sassone-Corsi, 2002). Pro správnou funkci cirkadiánního systému musí být jednotlivé oscilátory v těle synchronizovány, a to jak k denní době, tak mezi sebou navzájem. Tuto synchronizaci řídí právě SCN (Ralph, 1990). Centrální hodiny v SCN jsou jako jediné přímo spojeny s retinou a přijímají tak informace o světlé a tmavé fázi dne, podle kterých se nastavují. Centrální hodiny pak pomocí výstupních neuronálních i humorálních drah seřizují periferní oscilátory. Cirkadiánní systém savců je tedy hierarchicky uspořádaný a zachování vzájemných fázových vztahů mezi jeho jednotlivými složkami je podmínkou jeho správné funkce.

2.3.1 SUPRACHISMATICKÁ JÁDRA

Suprachiasmatická jádra hypotalamu (nucleus suprachiasmaticus, SCN) jsou párová jádra nacházející se po obou stranách spodiny třetí mozkové komory nad překřížením optických nervů, optickým chiasma (obr.1). Každé z jader je u hlodavců tvořeno 8 000 – 10 000 drobných neuronů. Morfologicky i funkčně lze jádra rozlišit na dvě části: dorsomediální (dmSCN) a ventrolaterální (vlSCN), které jsou mezi sebou propojeny množstvím synapsí (Leak a kol., 1999). Dorsomediální část, jinak také nazývána shell, se vyznačuje hlavně produkcí arginin vasopresinu (AVP), zatímco pro část ventrolaterální, core, je typický především vasoaktivní intestinální peptid (VIP). Většina neuronů SCN produkuje jako neurotransmiter kyselinu γ -aminomáselnou (GABA) (van den Pol, 1980; Abrahamson a kol., 2001; Albus a kol., 2005).



Obr. 1: Umístění suprachiasmatických jader SCN u savců po stranách spodiny 3. mozkové komory, nad optickým chiasma. Upraveno podle Fu a kol., 2003.

Individuální neurony SCN generují autonomní cirkadiánní rytmy (Welsh a kol., 1995). Je zajímavé, že když jsou tyto neurony pěstovány in vitro v disperzní kultuře, každý osciluje ve vlastní fázi rytmu a dokonce i neurony blízko sebe mohou být vzájemně v opačné fázi. Z toho vyplývá, že oscilátorem je vlastně každá buňka. Aby SCN mohlo generovat navenek jednotný rytmus, musejí být neurony navzájem synchronizovány (Welsh a kol., 1995; Yamaguchi a kol., 2003). Ke komunikaci a synchronizaci mezi jednotlivými neurony v SCN navzájem dochází jednak prostřednictvím elektrické aktivity a také pomocí různých neuropřenašečů.

Nejdůležitější se zdá být synchronizace pomocí neurotransmiteru GABA, který se nachází pravděpodobně ve všech neuronech SCN (Van den Pol, 1993; Albus, 2005). Další neurochemickou látkou, zodpovědnou za komunikaci a synchronizaci neuronů ve ventrolaterální části SCN, je již výše zmiňovaný VIP, společně s PHI (histidin-isoleucin peptid). Oba vznikají ze společného prekursoru a vážou se na tři typy receptorů přítomných v mozku – VPAC₁, VPAC₂ a PAC₁. V SCN hlodavců byla prokázána přítomnost pouze VPAC₂ a PAC₁ (Usdin a kol., 1994). Pokud v SCN chybí funkční VPAC₂ receptory, cirkadiánní rytmus genové exprese i elektrické aktivity měřený na úrovni celého jádra vymizí (Cutler a kol., 2003). VIP je tudíž nezbytný pro aktivaci a elektrickou synchronizaci neuronů SCN (Cutler a kol., 2003; Aton a kol., 2005). Hovoří pro to i fakt, že VIP je tvořený

v neuronech ventrolaterálního SCN, které přijímá světelné informace ze sítnice, a synchronizuje neurony v dorsomediální části SCN. Výhodou tvorby rytmů pomocí multioscilačního systému založeného na vzájemné komunikaci mezi jednotlivými buňkami SCN je, že neurony jsou nejen usměrňovány do správné fáze, ale také je velmi snížena variabilita v dlouhodobém udržování délky periody, a to mnohem lépe než by bylo možné pouze jedním neuronem (Liu a kol., 1997; Aton a Herzog, 2005).

Vstup informací z okolního prostředí do SCN je zprostředkován neuronálními spoji a humorálními signály.

Nervové dráhy, informující SCN o změnách ve vnějším a vnitřním prostředí, jsou dráhy retinohypotalamická, genikulohypotalamická a serotonergní.

Retinohypotalamická dráha (RHT) je monosynaptická, tvořena axony podskupiny retinálních fotosensitivních gangliových buněk (ipRGC) (Berson a kol., 2002). Fotoreceptorové buňky a ipRGC v sítnici zachycují a přenášejí světelnou informaci přes tuto přímou dráhu do SCN. ipRGC jsou schopny vést světelný signál do SCN i při absenci tyčinek i čípků, a to prostřednictvím fotopigmentu melanopsinu (Ruby a kol., 2002; Semo a kol., 2003). Mediátorem této dráhy je především glutamát (viz kap. 2.5.1.).

Genikulohypotalamická dráha (GHT) je polysynaptická, vede z retiny nejprve do intergenikulárního lístku talamu a odtud po přepojení do SCN. Mediátorem, který se uvolňuje na synapsích ve ventrolaterální části SCN, je neuropeptid Y (Card a Moore, 1989; Moore a Card, 1994). Pomocí této dráhy dochází k integraci světelných signálů s nesvětelnými, které jsou do talamu přiváděny z jiných částí mozku (Harrington, 1997). Třetí drahou, přivádějící informace do SCN, je dráha vedoucí z jader raphe mesencephala, využívající jako mediátor serotonin (shrnuje van Esseveldt a kol., 2000).

Humorální signály mohou na SCN působit prostřednictvím receptorů, které jsou přítomny na membránách jejich neuronů. Pravděpodobně nejdůležitější jsou melatoninové receptory. Melatonin je tvořen v epifyze a jeho tvorba je řízena z SCN, jeho exprese je nízká přes den a vysoká v noci (Klein a Moore, 1979). V SCN jsou přítomny dva podtypy melatoninových receptorů, MT1 a MT2 (Reppert a kol., 1995) a jejich hustota a rozdělení se liší v závislosti na živočišném druhu. Další receptory přítomné v SCN jsou například receptory leptinové (Hakansson a kol., 1998), ghrelinové (Zigman a kol., 2006) a insulinové (Unger a kol., 1989).

2.3.2 DALŠÍ OSCILÁTORY

Poznání molekulárního mechanismu řídicího chodu cirkadiánních hodin (viz kapitola 2.4) umožnilo objev jiných oblastí v těle savců, vykazujících rytmické cirkadiánní oscilace. Tyto oblasti se nacházejí nejen v jiných částech mozku, ale také v sítnici a periferních orgánech a tkáních.

Jako oscilátory mohou sloužit například i některá další jádra hypotalamu, dále jádra talamu, amygdala, bulbus olfactorius koncového mozku, mozeček a další (Abe a kol., 2001; Lamont a kol., 2005).

V retině byly cirkadiánní oscilátory lokalizovány nejen ve vnitřní vrstvě jader, ale také v samotné vrstvě fotoreceptorových buněk (Tosini a kol., 2007), například i čípky u lidí vykazují cirkadiánní rytmus v bioelektrickém potenciálu (Danilenko a kol., 2011).

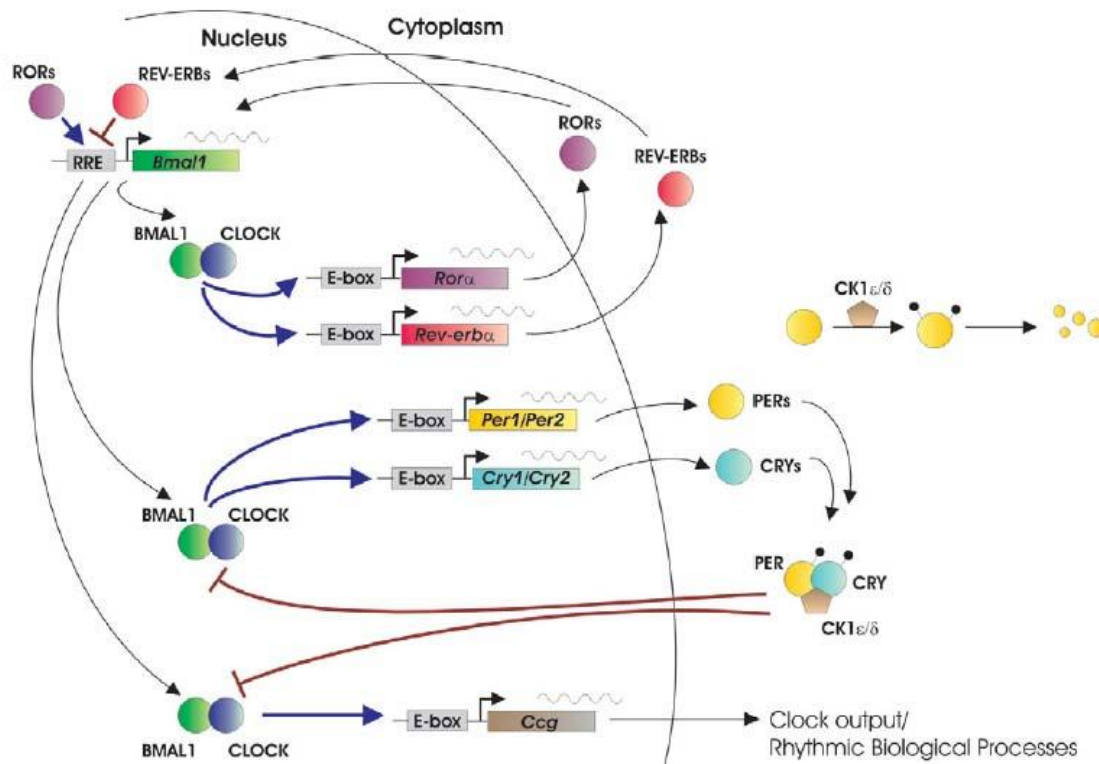
Z periferních orgánů vykazují cirkadiánní oscilace v genové expresi mimo jiné játra, plíce, ledviny, slezina, slinivka, srdce, žaludek, kosterní svaly, rohovka, štítná žláza, nadledviny a střevo (Balsalobre a kol., 1998; Sládek a kol., 2007; Yamamoto a kol., 2004). Předpokládá se, že téměř všechny buňky v periferních tkáních obsahují vlastní cirkadiánní hodiny. Tyto periferní hodiny jsou schopny autonomních oscilací, vzájemně jsou však pravidelně synchronizovány signály z SCN (Guo a kol., 2006). Yoo a kol. (2004) ukázal, že periferní buňky dokáží oscilovat i samostatně po izolaci z SCN. Po chirurgickém odstranění SCN však dochází k postupnému snížení amplitudy až vymizení rytmů v periferních orgánech v důsledku postupné desynchronizace jednotlivých rytmických buněk (Akhtar a spol., 2002).

2.4 MOLEKULÁRNÍ PODSTATA CIRKADIÁNNÍCH RYTMŮ

Odhalení skutečnosti, že rytmické změny u organismů mají svůj podklad v rytmické expresi určitých genů, přinesl až rozvoj metod molekulární biologie. Byly objeveny geny přímo zodpovědné za tvorbu cirkadiánních rytmů, které byly nazvány geny hodinovými. Podstata vzniku cirkadiánních oscilací je založena na mechanismu transkripčně-translační zpětnovazebné smyčky (Dunlap, 1999; Reppert a Weaver, 2001; Okamura a kol., 2002; Hastings a Herzog, 2004). Jedná se o autoregulační mechanismus řízený vzájemně propojenými zpětnými vazbami, které časově kontrolují transkripci hodinových genů a translaci jejich proteinů.

Do transkripčně-translačních zpětnovazebných smyček jsou zahrnuty následující hodinové geny – tři geny *Period* (*Per1,2,3*), dva *Cryptochrom* (*Cry1,2*), *Clock*, *Bmal1*, kasein kináza 1 epsilon (*CK1ε*), *Rev-erba* a *Rora*. Pozitivní část zpětnovazebné smyčky tvoří proteinové produkty CLOCK a BMAL1, které slouží jako transkripční aktivátory a zahajují transkripci genů *Per* a *Cry* vazbou na E-box elementy, přítomné na jejich promotorech. E-boxy jsou přítomny také na genech jaderných receptorů *Rev-erba* a *Rora*. Produkty genů *Per* a *Cry* - PER a CRY proteiny - tvoří heterodimery, vstupují do jádra, váží se na komplex CLOCK:BMAL1 a inhibují jeho aktivační vliv na transkripci svých genů, čímž uzavírají negativní zpětnovazebnou smyčku (Albrecht, 2004). Rytmická aktivace transkripce komplexem CLOCK:BMAL1 je dána cirkadiánními oscilacemi v transkripci hodinového genu *Bmal1*. Na regulaci jeho transkripce se podílí proteinové produkty genů REV-ERBa a RORA, které kompetují o vazebné místo na *Bmal1* promotoru a tím inhibují nebo aktivují jeho transkripci (Shearman a kol., 2000; Sato a kol., 2004). Díky tomu exprese genu *Bmal1* probíhá v opačné fázi než exprese genů *Per* a *Cry*. *Per* a *Cry* dosahují maxima během subjektivního dne a *Bmal1* dosahuje maxima naopak během subjektivní noci (Reppert a Weaver, 2001). CK1ε je protein-kináza, která fosforyluje PER protein, čímž jej připravuje pro degradaci, a snižuje tak jeho hladinu v cytoplazmě. Další funkcí CK1ε je např. hyperfosforylace komplexu CLOCK:BMAL1 (Eide a kol., 2001). Tyto spřažené pozitivní a negativní transkripčně-translační zpětnovazebné smyčky, které tvoří základ autonomního chodu cirkadiánních hodin, se opakují s cirkadiánní periodou (obr. 2). Délka periody rytmické genové exprese je regulována na úrovni post-translačních mechanismů (Lee a kol., 2001).

E-boxy se nacházejí také na promotorech dalších genů. Tyto geny nejsou nezbytné pro molekulární chod hodin, ale jsou hodinovým mechanismem řízeny a nazývají se proto hodinami kontrolované geny (z angl. „clock-controlled genes“). Tyto rytmicky spínané geny zajišťují přenos cirkadiánního signálu z centrálního pacemakeru do periferních tkání. Odhaduje se, že 5 až 10 % všech transkriptů v orgánech nebo tkáních je řízeno rytmicky (Jin a kol., 1999; Storch a kol., 2002). Velké množství z nich kóduje důležité proteiny, které se účastní regulace fyziologických funkcí (Lowrey a Takahashi, 2004).



Obr. 2: Zjednodušený model molekulárního mechanismu hodin u savců. Heterodimery CLOCK:BMAL1 aktivují transkripci *Per*, *Cry* a *Rev-erba*. Fosforylovaný komplex PER:CRY se váže na heterodimery CLOCK:BMAL1 a tím inhibuje transkripci svých genů. Přidatná smyčka zahrnuje inhibici transkripce *Bmal1* prostřednictvím REV-ERB α a aktivaci jeho transkripce prostřednictvím ROR α . Pro bližší porozumění viz text výše (převzato z Ko a Takahashi, 2006).

2.5 SYNCHRONIZACE SCN

2.5.1 SYNCHRONIZACE SVĚTLEM

Cirkadiánní hodiny v SCN jsou s vnějším dnem synchronizovány různými vstupními signály. Pro SCN dospělých savců je ale nejvýznamnějším synchronizátorem střídání světlé a tmavé fáze dne. Informace o světle jsou přenášeny z retiny do ventrolaterální části SCN prostřednictvím výše zmíněných drah, kde indukují genovou expresi. Světelný impuls způsobí na synapsích v SCN výlev glutamátu a PACAP (pituitary adenylate cyclase-activating polypeptid). Neuropeptid PACAP má modulační funkci – zvyšuje efekt glutamátu (Michel a kol., 2006). Glutamát působí na NMDA a AMPA receptory a depolarizuje membránu neuronů, což způsobuje výlev vápníku. Vápník aktivuje síť kináz (calcium/calmodulin-dependent protein kinase (CaMK), mitogen-activated protein kinase (MAPK), protein kinase A (PKA)), což vede k fosforylaci CREB (calcium/cAMP response

element binding protein) (Ginty a kol., 1993; Obrietan a kol., 1998). Fosforylovaný CREB indukuje transkripci některých genů (včetně *c-fos* a *Per1*) vazbou na calcium/cAMP response elements (CREs) (Field a kol., 2000; Shigeyoshi a kol., 1997). Změny v expresi *Per* genů v SCN jsou považovány za nejdůležitější mechanismus, kterým světlo seřizuje centrální hodiny u dospělých jedinců (Albrecht a kol., 2001).

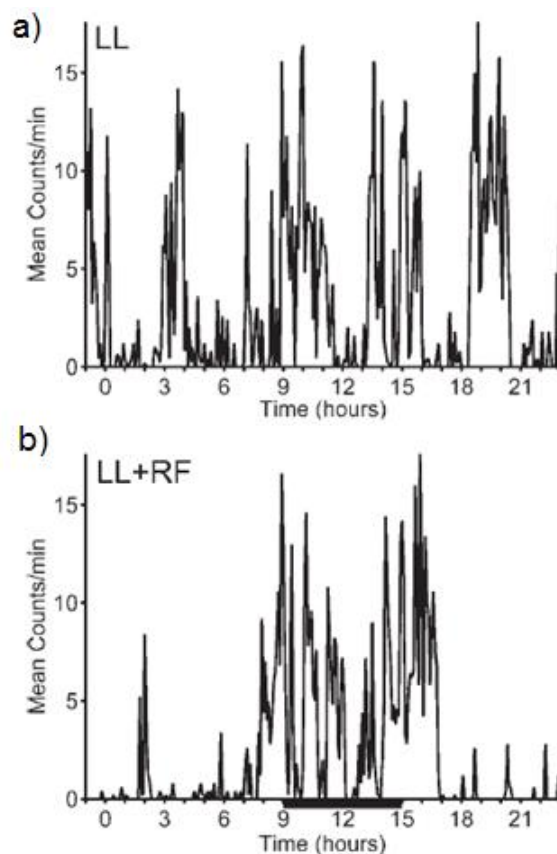
Expozice stálému světlu (LL, light-light) narušuje cirkadiánní rytmy a způsobuje u savců postupnou ztrátu rytmicity (Nováková a kol., 2011; Pittendrigh a Daan, 1976). Mechanismus ztráty rytmů vlivem LL zřejmě spočívá ve vzájemné desynchronizaci jednotlivých neuronů SCN, schopnost jednotlivých buněčných oscilátorů generovat cirkadiánní rytmy však narušena není. Následkem ztráty synchronizace mezi jednotlivými oscilátory v SCN dochází k narušení výstupních rytmů, včetně rytmu v pohybové aktivitě (Ohta a kol., 2005).

2.5.2 NESVĚTELNÁ SYNCHRONIZACE

Kromě světla mohou být dalšími synchronizačními signály např. pohybová aktivita (Maywood, 1999) nebo melatonin (Davis a Mannion, 1988). Nesvětelná synchronizace se uplatňuje hlavně během ontogeneze, především v prenatálním období (viz kapitola 2.7).

Melatonin je hormon, který vykazuje výrazný cirkadiánní rytmus s nárůstem během subjektivní noci. Tvorba melatoninu v šišince je řízena světlem, a to sice dvěma způsoby. Jednak percepce světla přes sítnici přímo inhibuje syntézu melatoninu (Illnerová a kol., 1978) a pak rytmus střídání světla a tmy nastavuje centrální oscilátor v SCN a ten pak přes výstupní signály řídí rytmus tvorby melatoninu v epifýze. SCN je s epifýzou spojeno multisynaptickou nervovou dráhou. Na posledních synapsích přímo v epifýze pak dochází ke zvýšenému výlevu noradrenalinu během noci (Kalsbeek a Buijs, 2002; Moller a Baeres, 2002). Melatonin podávaný večer způsobuje předběhnutí hodin, jeho ranní podávání hodiny zpožďuje (Armstrong a kol., 1986).

Za podmínek, kdy není cirkadiánní systém synchronizován střídáním světla a tmy, například na režimu LL, může k synchronizaci centrálních hodin posloužit i například rytmický příjem potravy, který jednak obnovuje cirkadiánní rytmus v pohybové aktivitě (obr.3), ale také rytmickou expresi některých hodinových genů v SCN (Nováková a kol., 2011).



Obr. 3: 24-hodinové profily pohybové aktivity samic chované po dobu 30ti dní na LL a) krmené ad libitum, b) krmené jen v době 9-15 hod. Na ose y je průměrná pohybová aktivita, na ose x je reálný čas (převzato z Nováková a kol., 2011).

2.6 SYNCHRONIZACE PERIFERNÍCH ORGÁNŮ

Oscilátory v periferních tkáních savců nejsou na rozdíl od SCN přímo řízeny světlem, neboť postrádají přímé spojení se sítnicí. Jsou synchronizovány prostřednictvím výstupních multisynaptických spojení z SCN a jsou pod jeho přímou neuronální (Bartness a kol., 2001) a humorální (Balsalobre a kol., 2000) kontrolou. Mechanismus, jakým signály z SCN seřizují hodiny v periferních tkáních, není dosud přesně znám. Některé hodinové geny těchto periferních oscilátorů jsou zřejmě citlivé k signálům z SCN a mohou tedy chod periferních hodin podle těchto signálů přenastavit. Ty pak pomocí rytmické kontroly výše zmiňovaných hodinami kontrolovaných genů umožňují převod synchronizovaných molekulárních oscilací na lokální fyziologické funkce v daných tkáních (Jin a kol., 1999).

Výstupní dráhy, jimiž je rytmický signál předáván na periferii, vedou ze SCN do hypothalamu a dalších důležitých oblastí mozku, které regulují mnohé fyziologické procesy a změny v chování (shrnutí v Silver a Schwartz, 2003).

Periferní orgány a tkáně jsou také zřejmě synchronizovány prostřednictvím humorální signalizace, např. glukokortikoidy (Balsalobre a kol., 2000).

Oscilátory v periferních tkáních mohou být synchronizovány i dalšími mechanismy. Například změnou režimu v příjmu potravy. Omezení doby přístupu k potravě způsobuje výraznou změnu fáze exprese hodinových genů v játrech, i přes to, že cyklus střídání světla a tmy zůstává nezměněn (Stokkan a kol., 2001; Hara a kol., 2001). Režim v příjmu potravy je pro některé periferní oscilátory významným synchronizátorem (Schibler a kol., 2003). Pokud je pokusným zvířatům umožněn přístup k potravě pouze po několik hodin během dne, jedná se o tzv. „restricted feeding“ (RF). Pokud je nočním živočichům umožněn příjem potravy pouze během světlé části dne, dochází k posunu fáze rytmu v expresi hodinových genů v játrech (Damiola a kol., 2000). Tento fázový posun se však týká pouze periferních orgánů, RF nemá žádný vliv na změnu fáze exprese genů v SCN (Hara a kol., 2001). SCN nejsou pro fázový posun periferních oscilátorů vlivem RF zapotřebí, protože k němu dochází i u myší, kterým byla provedena léze SCN. Vlivem RF dochází také k typickému anticipačnímu chování, tzn., že podání potravy předchází zvýšená pohybová aktivita zvířete. Pro vznik této anticipační aktivity není SCN také potřeba, jelikož toto chování lze pozorovat i u myší podrobených lézi SCN (Stokkan a kol., 2001). Současně se zvýšenou aktivitou je zvýšena i tělesná teplota a hladina kortikosteronu. Před začátkem příjmu potravy dochází též ke snížení hladiny glukagonu v krevní plazmě a zvýšení hladiny ketonových látek a volných mastných kyselin (Hara a kol., 2001). I přes poměrně velké úsilí se prozatím nepodařilo lokalizovat v těle savců oscilátor, který řídí anticipační chování předcházející příjem potravy v podmínkách RF.

Kromě režimu v příjmu potravy se při synchronizaci periferních oscilátorů také uplatňuje rytmická změna v tělesné teplotě (Brown a kol., 2002; Buhr a kol., 2010).

2.7 ONTOGENETICKÝ VÝVOJ CIRKADIÁNNÍCH HODIN V SCN

Tato práce je zaměřena na ontogenetický vývoj cirkadiánních hodin v SCN u dvou kmenů laboratorního potkana, tj. u klasického modelového kmene Wistar a dále u kmene spontánně hypertenzního potkana (SHR).

Morfologický vývoj SCN byl dosud sledován nejvíce u potkana kmene Wistar (Moore, 1991). Délka březosti je u tohoto kmene 22 až 23 dní. Morfologicky se SCN u potkanů formuje postupně. Neurogeneze probíhá od 14. embryonálního dne věku (E14) do E17. SCN vzniká ze specializované zóny ventrálního diencefalického zárodečného (germinálního) epitelu, který je součástí periventrikulární skupiny buněk. Jako první se vyvíjejí neurony, které tvoří obal („shell“) a to v E15 a E16, a neurony tvořící jádro („core“) později, tj. v E16 až E17. Neurogeneze je sice ukončena v E18, ale postupné dozrávání neuronální morfologie trvá až do 10. dne po narození (P10).

Synaptogeneze v SCN je převážně postnatální proces. V E19 je totiž počet synapsí v SCN ještě minimální a jejich počet narůstá pomalu do P4 a mezi P4 a P10 začne rychle stoupat. V P10 již dosahuje hustota synapsí stejné úrovně jako u dospělého a také jsou již přítomny všechny typy synapsí (Moore a Bernstein, 1989).

Vývoj rytmicity SCN během časně ontogeneze byl nejprve zkoumán s pomocí sledování výstupních rytmů. Vývoj rytmu v metabolické aktivitě buněk v SCN byl sledován prostřednictvím vychytávání C14-značené deoxyglukózy (Reppert a Schwartz, 1984). U potkana byl rozdíl mezi denní a noční hodnotou v metabolické aktivitě pozorován již před narozením v pozdním embryonálním stádiu a to mezi E19 a E22 (Reppert a Schwartz, 1984). Rytmus v elektrické aktivitě neuronů v SCN byl zaznamenán poprvé v E22 a postupně jeho amplituda vzrůstala až do P14 (Shibata a Moore, 1987). Později, s objevem hodinových genů u savců byl vývoj rytmicity v SCN sledován pomocí vývoje rytmů v denních profilech exprese hodinových genů. V práci autorů Sládek a kol. (2004) byla v SCN potkana sledována exprese pěti hodinových genů, *Per1*, *Per2*, *Cry1*, *Bmal1* a *Clock*, a tří proteinů PER1, PER2 a CRY1, v průběhu 24 hodin, a to ve třech vývojových stádiích - v E19, P3 a P10. Věk E19 byl vybrán, protože je v tuto dobu již ukončena neurogeneze SCN, P3 představuje dobu, kdy je v SCN ještě nízký počet synapsí a v P10 je synaptogeneze v SCN ukončena (Moore a Bernstein, 1989). Bylo zjištěno, že všechny sledované geny byly v E19 již exprimovány, nikoliv však rytmicky. Na rozdíl od mRNA

nebyly v tomto raném vývojovém stádiu detekovány hladiny žádného ze sledovaných proteinů. O den později, tj. v E20, se začínají objevovat rytmy v expresi genů *Per1* a *Per2* (Ohta a kol. 2002; Kováčiková a kol., 2006). V P3 byl zjištěn rytmus v expresi genů *Per1*, *Per2*, *Bmal1* a *Cry1*, avšak amplituda tohoto rytmu byla ještě stále nižší než v P10, kdy rytmus v expresi těchto genů odpovídal rytmům naměřeným u dospělých zvířat. Exprese genu *Clock* nevykazuje v SCN cirkadiánní rytmus v žádném ze sledovaných vývojových stádií (Sládek a kol., 2004), stejně jako je tomu u dospělých zvířat. Z těchto výsledků vyplývá, že rytmy v expresi hodinových genů se v SCN vyvíjí postupně až do 10. dne po narození. V experimentech, které provedli Ohta a kol. (Ohta a kol., 2002, 2003), byl také naměřen cirkadiánní rytmus v expresi hodinových genů *Per1* a *Per2* ve všech sledovaných fázích vývoje potkaních mláďat, tj. v E20, P6, P13 a P20.

Kmen spontánně hypertenzních potkanů (SHR – spontaneously hypertensiv rat) představuje zvířecí model, používaný ke studiu spontánní hypertenze a s ní spojených kardiovaskulárních a metabolických onemocnění. Stejně jako u lidí se hypertenze u těchto potkanů začíná projevovat až s přibývajícím věkem. Kmen byl vyšlechtěn v 60. letech minulého století Okamotoem a jeho kolegy, selekcí v chovu potkanů Wistar-Kyoto (WKY), kdy vybírali pouze jedince s vysokým krevním tlakem (Okamoto a kol., 1961). Zvyšování krevního tlaku začíná u těchto jedinců spontánně mezi 5. až 6. týdnem života a u dospělých jedinců dosahuje systolický tlak 180 – 200 mmHg. Mezi 40. až 50. týdnem života se u nich začínají projevovat kardiovaskulární obtíže jako je hypertrofie srdce a cév (Conrad, 1995).

Centrální hodiny v SCN dospělých zvířat běží za konstantních podmínek rychleji, tzn. s kratší periodou, než u kontrolního kmene Wistar (Sládek a kol., 2012). Peters a kol. zjistili, že hladina VIP, který hraje důležitou roli v synchronizaci a komunikaci mezi neurony v SCN (viz kapitola 2.3.1), je u SHR zvýšená oproti kontrolním Wistar Kyoto (WKY) potkanům, zatímco hladina gastrin-releasing peptidu (GRP), dalšího neuropeptidu, který je přítomen v neuronech SCN, se od WKY potkanů neliší (Peters a kol., 1994).

Ontogeneze cirkadiánního systému nebyla u SHR dosud zkoumána. Výsledky řady prací naznačují rozdíly v mateřském chování samic SHR a WKY potkanů. Samice SHR kojí svá mláďata častěji, více o ně pečují a zůstávají s nimi déle i po té, co jsou mláďata již nakrmena. Oproti WKY samicím produkují samice SHR méně mléka a jejich mláďata se dožadují častějšího krmení. Pokud jsou matkám mláďata vyměněna, tak, že SHR matky

vychovávat WKY mláďata a naopak, pak mláďata SHR v dospělosti vykazují signifikantně nižší krevní tlak, než ta mláďata, která byla vychovávána u svých původních matek, zatímco tepová frekvence se neliší. U mláďat WKY potkana, která jsou vychovávána SHR matkou, zůstávají krevní tlak i tepová frekvence v dospělosti nezměněny (Gouldsbrough a kol., 1997).

2.8 SYNCHRONIZACE CENTRÁLNÍCH HODIN BĚHEM ONTOGENEZE

Cirkadiánní hodiny v SCN začínají vykazovat oscilace již v pozdním embryonálním stádiu (viz kapitola 2.7). Během prenatálního a časného postnatálního období jsou tyto hodiny řízeny mateřskými signály, které je synchronizují. U dospělých zvířat je nejvýznamnějším synchronizátorem cirkadiánních hodin rytmus střídání světla a tmy (viz kapitola 2.5.1). Avšak v rané ontogenezi se uplatňují nesvětelné podněty.

Ve fetálním období vývoje je informace o světlé fázi dne z prostředí přenášena na plod prostřednictvím matky. Pro synchronizaci fetálních SCN jsou důležitá intaktní SCN matky. Chirurgické odstranění SCN matky v rané fázi gestace neovlivní vývoj rytmů u jejich jednotlivých potomků, tyto rytmy však nejsou mezi sebou synchronizovány do stejné fáze (Reppert a Schwartz, 1986b; Honma a kol., 1984; Shibata a Moore, 1988). Z toho vyplývá, že matčino SCN má funkci pouze synchronizační, ale není nezbytné pro to, aby se v SCN mláďat vyvinul mechanismus generující rytmy. Podobné závěry byly učiněny také na základě výsledků novější studie, kdy byly mateřské cirkadiánní hodiny vyřazeny z funkce geneticky. Matky, které byly arytmičné z důvodu pozměnění funkce hodinových genů *Per1* a *Per2* nebo *Per2* a *Cry1* (tzv. „double mutant“), byly zabřeznuty samci, kteří měli funkční cirkadiánní hodiny („wild-type“). Heterozygotní potomci měli sice vlastní funkční cirkadiánní hodiny, ale přitom byli vychováni matkou, která hodiny funkční neměla. U jednotlivých mláďat se cirkadiánní hodiny vyvinuly stejně jako u kontrol, ale mláďata jednoho vrhu nebyla vzájemně synchronizována (Jud a Albrecht, 2006). Tyto výsledky opět potvrdily, že vývoj cirkadiánních rytmů není závislý na funkčních hodinách matky.

Mechanismy, jakými matka nastavuje fázi cirkadiánních rytmů plodů, nejsou stále ještě zcela známy. Pravděpodobně se jedná o celý komplex rytmických signálů, které

mohou fetální SCN synchronizovat, např. rytmy behaviorální, metabolické, hormonální, apod.

Rané studie se zaměřovaly hlavně na působení humorální, a to především na hormon melatonin, který prostupuje placentou (Reppert a kol., 1979; McMillen a Nowak, 1989). Avšak chirurgické odstranění matčiny epifýzy nemělo výrazný vliv na koordinaci fetálních cirkadiánních rytmů. Také odstranění jiných matčiných endokrinních orgánů, jako hypofýzy, nadledvinek, štítné žlázy a příštítných tělísek nebo vaječníků, nenarušilo mateřskou synchronizaci metabolické aktivity fetálního SCN (Reppert a Schwartz, 1986a). Výsledky pozdější práce však naopak ukázaly na nezbytnost intaktní mateřské epifýzy na synchronizaci hodin mláďat jednoho vrhu (Bellavia a kol., 2006).

Dalším mechanismem, který hraje roli v synchronizaci fétů je dopaminergní systém. Periodické podávání agonisty D₁-receptoru, matkám s lézí SCN synchronizovalo plody a novorozená mláďata potkanů a křečků (Grosse a Davis, 1999; Viswanathan a kol., 1994). Stejně jako melatonin mohou i dopaminergní podněty působit přímo na SCN, které exprimuje D₁-receptor (Weaver a kol., 1992). Dopamin působí jako signál pro světlou část dne a melatonin pro tmavou část dne. Jakým mechanismem jsou však tyto signály spojeny s mechanismem, který seřizuje fetální hodiny, není známo.

Dalším mechanismem, který by se mohl na mateřské synchronizaci fétů podílet, je signalizace prostřednictvím rytmického příjmu potravy. Weaver a Reppert (1989) prováděli experimenty, ve kterých byl březím samicím s odstraněnými SCN omezen přístup k potravě pouze na určitou část dne. Zjistili, že tato změna režimu v příjmu potravy synchronizovala jejich féty. Podobně, pokud byl cirkadiánní systém březích samic desynchronizován vlivem vystavení stálému světlu, byly rytmy v expresi genů v SCN jejich novorozených mláďat desynchronizovány. Změna režimu v příjmu potravy březích samic tyto rytmy synchronizovala (Nováková a kol. 2010). Pokud však byly březí samice synchronizovány vnějším světelným režimem, změna v příjmu potravy neměla na fázi rytmů v SCN jejich novorozených mláďat žádný vliv. Tento výsledek naznačuje, že fetální hodiny v SCN jsou primárně synchronizovány rytmickými signály z mateřského SCN, ale v podmínkách, kdy může být tento rytmický signál oslaben, jako např. v podmínkách stálého světla, může pravidelný příjem potravy hrát důležitou roli v synchronizaci hodin v SCN fétů a novorozených mláďat. Signály spojené s rytmickým kolísáním hladin živin

a metabolitů v krvi jsou u dospělých jedinců schopny synchronizovat periferní oscilátory, nikoliv však SCN (Brown a kol., 2002; Rutter a kol., 2002; Stokkan a kol., 2001).

Z dostupné literatury tak vyplývá, že mateřská synchronizace není zprostředkována pouze jedním mechanismem, ale spíše se jedná o komplex mateřských signálů, které se při synchronizaci fetálních biologických hodin navzájem doplňují.

Mateřský cirkadiánní systém synchronizuje časový systém mláďat i po porodu u altriciálních hlodavců, jako jsou myši, potkani a křečci. Mateřské signály jsou nejdůležitější během prvních dní života, než mláďata otevrou oči. V přirozených podmínkách nejsou mláďata pravděpodobně nikdy přímo vystavena cyklu střídání světla a tmy. Matka proto pomáhá udržovat a posilovat jejich synchronizaci s vnějším světem až do té doby, než jsou schopna samostatného života a opustí hnízdo. Matky jsou aktivní během noci, kdy si shánějí potravu mimo hnízdo a během dne odpočívají a zůstávají v kontaktu s mláďaty. Dokonce i v laboratorních podmínkách jsou matky aktivní a nemají kontakt s mláďaty během aktuální nebo subjektivní noci (Viswanathan, 1999). Důležitý synchronizační vliv mateřských podnětů na neonatální hodiny byl dokázán ve studiích, kdy byla mláďata vychovávána náhradní matkou, tzv. „cross-fostering“ studie. Mláďata jsou synchronizována s náhradní matkou, pokud k její výměně dojde v prvních dnech po narození (Duffield a Ebling, 1998; Hiroshige a kol., 1982; Honma a kol., 1987; Reppert a kol., 1984; Takahashi a Deguchi, 1983).

Rytmičné střídání matčiny přítomnosti a nepřítomnosti v hnízdě může také synchronizovat mláďata potkanů (Shimoda a kol., 1986; Sugishita a kol., 1993) a myši (Viswanathan). Větší význam má zřejmě matčina nepřítomnost, než její péče (Ohta a kol., 2003). Matčina nepřítomnost během světlé části dne kompletně obrátí fázi cirkadiánního rytmu v hladinách *Per1* a *Per2* mRNA v neonatálním SCN, zatímco výměna matek synchronizovaných k opačnému světelnému režimu posune fázi rytmu exprese *Per1* v SCN pouze o několik hodin (Ohta a kol., 2002). Tyto výsledky naznačují, že periodická absence matky během obvyklé doby kojení přenastavuje fázi neonatálních cirkadiánních hodin (Ohta a kol., 2003). Nepřítomnost matky je pro novorozence stresující a mění citlivost jejich osy hypotalamus – hypofýza – nadledvinky k vnějším stimulům (Dent a kol., 2000; Ohta a kol., 2003). Stres by se tedy mohl na synchronizaci novorozených mláďat podílet. S cyklem přítomnosti a nepřítomnosti matky přímo souvisí i cyklus krmení novorozených

mláďat. Důležité je, že fyzický kontakt s matkou je pro mláďata signálem subjektivního dne a matčina nepřítomnost je signálem subjektivní noci (Viswanathan, 1999).

Neuronální dráhy odpovědné za synchronizaci při kontaktu matky s mláďaty nejsou známy, ačkoliv mohou být podobné těm, které u dospělých jedinců zprostředkují synchronizaci prostřednictvím indukovaného vybuzení („arousal“) (Hastings a kol., 1998).

Mateřská synchronizace mláďat postupně klesá se stoupající zralostí jejich vlastního cirkadiánního systému (Reppert a kol., 1984; Shimoda a kol., 1986; Viswanathan, 1999). Jako věk, který je kritický pro schopnost SCN být synchronizován světlem je považován věk P5 (Duncan a kol., 1986; Reppert a kol., 1984; Sasaki a kol., 1984). Do věku P5 není ještě cirkadiánní systém schopen se sám plně synchronizovat s okolními světelnými podmínkami (Duncan a kol., 1986). Ve věku P6 jsou mláďata schopna se plně synchronizovat s novým světelným režimem (Ohta a kol., 2002). SCN potkanů jsou citlivá na světlo již první den po narození (Matějů a kol., 2009). U dospělých zvířat je světelná indukce exprese *c-fos* omezena na určitou cirkadiánní dobu („gating mechanism“), a to konkrétně na subjektivní noc, kdy světelné impulzy způsobí fázový posun cirkadiánní rytmicity (Colwell a Foster, 1992; Kornhauser a kol., 1990). Cirkadiánní „gating“ je předpokladem pro umožnění synchronizace prostřednictvím světla a tmy. Weaver a Reppert (1995) toto pozorovali u potkanů poprvé v P2. Jiná studie ukázala, že „gating“ mechanismus se postupně vyvíjí až do P10 (Matějů a kol., 2009).

Z výsledků studií tedy vyplývá, že SCN je fotosenzitivní okamžitě po narození, světelná synchronizace se však postupně vyvíjí během prvního týdne po narození. Schopnost synchronizace je tak zřejmě závislá na dosažení určitého vývojového stupně, který pravděpodobně souvisí s vývojem funkčních synapsí mezi jednotlivými oscilátory v SCN. Proto také asi doba, kdy začínají být SCN synchronizována světlem, odpovídá době ukončení synaptogeneze v SCN.

Jak se vyvíjí neonatální centrální hodiny za arytmičtých podmínek, například pokud jsou matky chovány na LL, není příliš známo. Ohta a kol. zjistili, že pokud jsou mláďata po narození chována na LL, tak dojde nejen k akutnímu narušení vývoje cirkadiánních hodin, ale i k dlouhodobému efektu. Zvířata, která byla po narození chována na stálém světle, jsou v dospělosti náchylnější ke ztrátě rytmicity pokud jsou opakovaně vystavena stálému světlu, ve srovnání se zvířaty, která byla po narození chována na normálním světelném režimu (Ohta a kol., 2006).

3. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cílem této práce bylo zjistit vliv mateřského chování na vyvíjející se hodiny v SCN laboratorního potkana. Specifickými cíly práce bylo objasnit i) do jaké míry se mateřské signály podílejí na vývoji a seřizování cirkadiánních hodin mláďat potkana kmene Wistar a jaký vliv má narušení rytmických mateřských signálů na vývoj těchto hodin, ii) jak se vyvíjí cirkadiánní hodiny v SCN mláďat potkanů kmene SHR a jaký vliv má na tento vývoj změna v chování matky.

4. MATERIÁL A METODIKA

4.1 EXPERIMENTÁLNÍ ZVÍŘATA

K experimentům byla použita mláďata a dospělí potkani (*Rattus norvegicus*) kmene Wistar (Velaz s.r.o., ČR) a kmene SHR (FGÚ AV, ČR).

Zvířata byla krmena standardní laboratorní krmnou směsí a měla přístup k potravě a pitné vodě *ad libitum*. Pouze v některých experimentech byl přístup k potravě omezen na dobu specifikovanou níže.

Teplota ve zvěřinci byla udržována na $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Denní světlo bylo zajištěno 40 W zářivkami, intenzita osvětlení se pohybovala mezi 150 a 250 lux, podle umístění chovných klecí. Definované světelné režimy byly pod kontrolou automatických spínacích hodin.

4.2 USPOŘÁDÁNÍ EXPERIMENTŮ

4.2.1 EXPERIMENT 1: Vliv prenatalního nastavení hodin v SCN na jejich vývoj během časného postnatálního období

Pro studium vlivu prenatalního nastavení hodin v SCN byla využita metoda, při které byla mláďata od narození vychovávána náhradní matkou, tzv. metoda cross-fostering. Samice kmene Wistar byly chovány v oddělených zvěřincích na opačných světelných režimech, tj. na LD12:12 (světlo od 6:00 do 18:00) a DL12:12 (světlo od 18:00 do 6:00) po dobu 3 týdnů. Samice měly během celého experimentu přístup k vodě i potravě *ad libitum*. Samice byly připuštěny k samcům (postup viz níže) a po zabřeznutí byly dále chovány na původním světelném režimu až do konce experimentu. Do 12ti hodin po porodu byly jednotlivé vrhy mláďat matkám vyměněny tak, aby mláďata byla vychovávána náhradními matkami chovanými na opačných světelných režimech, než byly chovány jejich skutečné matky. V den odběru (tj. v době, kdy mláďata byla 10 dní stará) byly matky s mláďaty umístěny do stálé tmy (DD), tzn., že jim v obvyklý čas nebylo rozsvíceno, aby se zamezilo přímému účinku světla na mláďata. Mláďata byla odebírána v postnatálním dni 10 (P10) po 4 hodinách během doby 24 hodin, počínaje dobou

očekávaného rozsvícení, tj. 6:00 resp. 18:00. Čas předpokládaného rozsvícení je označen jako cirkadiánní čas 0 (CT0, circadian time). V každém časovém bodu byla usmrcena minimálně 4 mláďata rychlou dekapitací.

Abychom mohli přesně určit den porodu a načasovat tak průběh vyměňování jednotlivých vrhů, prováděli jsme kontrolované zabřezávání pomocí vaginálních výplachů. Z tvaru buněk sliznice lze určit fázi ovulačního cyklu, ve které se samice potkana nachází. Pokud jsme našli při dopoledním výplachu proestrické buňky, samice byly přes noc spáreny se samci. Pokud byly v následném ranním výplachu nalezeny spermie, označili jsme den nálezu spermií jako E0.

Po usmrcení byly mozky mláďat vyjmuty a zpracovány dle postupu popsaneho níže pro stanovení denních profilů exprese hodinových genů *Per1*, *Per2*, *Bmal1* a *Rev-erba* pomocí in situ hybridizace.

4.2.2 EXPERIMENT 2: Vliv stálého světla a změny režimu v příjmu potravy matky na vývoj rytmické exprese vybraných hodinových genů v SCN jejich mláďat

Cílem tohoto experimentu bylo zjistit, jaký vliv má na vývoj cirkadiánních hodin v SCN absence rytmického chování matky (navozená vystavením podmínkám LL) a zda může rytmické chování matky v těchto podmínkách (navozené omezením doby příjmu potravy) ovlivnit postnatální vývoj hodin v SCN.

Samice potkana kmene Wistar chované na LD 12:12 (světlo od 6:00 do 18:00) po dobu nejméně 3 týdnů byly v den zabřeznutí vypuštěny na režim LL a zůstaly na něm až do ukončení experimentu. Zabřezávání probíhalo stejným způsobem jako v Exp. 1 (viz výše). Samice skupiny 1 měly přístup k vodě i potravě *ad libitum*. Samice skupiny 2 měly přístup k potravě pouze v době od 9:00 do 16:00. Přístup k vodě měly samice obou skupin *ad libitum*. Omezení doby příjmu potravy u skupiny 2 trvalo od prvního dne po porodu (P1) až do konce experimentu. Mláďata byla odebírána ve věcích P10 a P20. Odběry byly prováděny po 4 hodinách během 24 hodinového cyklu. V každém časovém bodě bylo usmrceno 5 mláďat rychlou dekapitací. Po usmrcení byly mozky mláďat vyjmuty a zpracovány dle postupu popsaneho níže pro stanovení denních profilů exprese hodinových genů *Per2*, *Bmal1* a *Rev-erba* pomocí in situ hybridizace.

Část mláďat z obou skupiny byla ponechána naživu a byla u nich sledována pohybová aktivita v období po odstavu. Mláďata chovaná s matkami na LL byla odstavena

25. den po narození, umístěna do samostatných klecí a vypuštěna do stálé tmy na dobu 4 týdnů. Pohybová aktivita byla sledována pomocí techniky popsané v bodě 3.3. Po 4 týdnech na DD byla chována 2 měsíce na světelném režimu LD12:12 a poté opět vypuštěna na DD na dobu 4 týdnů, kdy u nich byla opět monitorována pohybová aktivita.

4.2.3 EXPERIMENT 3: Vývoj denních profilů exprese vybraných hodinových genů v SCN mláďat potkana kmene SHR

Samice potkana kmene SHR byly chovány za standardních světelných podmínek LD 12:12 (světlo od 6:00 do 18:00). Přístup k vodě i potravě měly samice *ad libitum*. Samice byly cíleně zabřezávány dle postupu popsaného v Exp. 1. Mláďata byla odebírána ve věcích P1, P10, P20 a P30 každé 4 hodiny během 24 hodinového cyklu, a to od CT0 do CT20. Aby bylo zamezeno přímému účinku světla na mláďata, byly v den jejich odběru matky s mláďaty vypuštěny do DD, tzn., že se jim v obvyklý čas nerozsvítilo. V každém časovém bodě bylo usmrceno 3-5 mláďat rychlou dekapitací. Po usmrcení byly mozky mláďat vyjmuty a zpracovány dle postupu popsaného v 4.4.2 pro stanovení denních profilů exprese hodinových genů *Per1*, *Per2*, *Bmal1* a *Rev-erba* v SCN.

4.2.4 EXPERIMENT 4: Vliv vystavení matek změně režimu v příjmu potravy na vývoj rytmické exprese vybraných hodinových genů v SCN mláďat potkanů kmene Wistar a SHR

V tomto experimentu bylo zkoumáno, zda změna chování matky, vyvolaná omezením doby přístupu k potravě v období kdy kojí svá mláďata, ovlivní vývoj cirkadiánních hodin v SCN těchto mláďat během prenatalního a postnatalního období. Vliv vystavení matek změně režimu v příjmu potravy byl porovnáván u potkanů kmene Wistar a SHR.

Samice potkanů Wistar a SHR byly chovány za standardních světelných podmínek LD 12:12 (světlo od 6:00 do 18:00). Samice skupiny 1 měly přístup k vodě a potravě *ad libitum*. Samice skupiny 2 dostávaly potravu pouze od 10:00 do 16:00, přístup k vodě jim nebyl časově omezen. Omezení doby příjmu potravy trvalo od zabřeznutí samic (tj. od počátku embryonálního vývoje plodů, E0) až do konce experimentu. Ve věku P1 (SHR) a P10 (SHR i Wistar) byla mláďata odebírána každé 4 hodiny po dobu 24 hodinového cyklu. Aby se zamezilo přímému účinku světla na mláďata, byly v den odběru matky

s mláděty umístěny do DD, tzn., že se jim v obvyklý čas nerozsvítilo. V každém časovém bodě bylo usmrceno 3-5 mláďat rychlou dekapitací. Po usmrcení byly mozky mláďat vyjmuty a zpracovány dle postupu popsáno níže pro stanovení denních profilů exprese hodinových genů *Per2*, *Bmal1* a *Rev-erba*.

4.3 SLEDOVÁNÍ POHYBOVÉ AKTIVITY

Pohybová aktivita mláďat po odstavu byla sledována pomocí systému CAMS (Circadian Activity Monitoring System, INSERM, Francie), který používá ke snímání pohybu zvířat detektory infračerveného záření. Získaná data jsou ukládána do počítače vybaveného softwarem umožňujícím sledovat aktuální záznamy z jednotlivých detektorů (tzv. aktogramy) a zároveň tyto záznamy ukládat ve formě souborů. Tyto soubory je pak možno analyzovat pomocí programu Actiview (Mini Mitter Copany, Inc. Bend, Oregon USA).

4.4 STANOVENÍ EXPRESE VYBRANÝCH HODINOVÝCH GENŮ PROSTŘEDNICTVÍM IN SITU HYBRIDIZACE

In situ hybridizace je metoda molekulární biologie umožňující lokalizaci hledané mRNA nebo proteinu ve tkáni prostřednictvím navázáním komplementární značené sondy (v našem případě S^{35}).

Hybridizační protokol vypadá následovně:

1. Prehybridizace
2. Vlastní hybridizace
3. Post-hybridizační odmytí nenavázané proby a snížení backgroundu
4. Detekce hybridizačního signálu

4.4.1 MATERIÁL A VYBAVENÍ

Přístroje:

- Cryocut Leica CM 1850
- pH metr Denver Instruments BASIC

- termoblok Biometra TB1
- vodní lázně Julaba, Memmert
- horizontální elektroforéza Sigma
- spektrofotometr Eppendorf
- stereomikroskop Olympus SZX9
- vyvolávačka Optimax x-raj procesor
- counter Beckman LS 6500

Chemikálie:

- ^{35}S -UTP (1250 mCi/mmol; 10 mCi/ml) (Lacomel)
- diethylpyrokarbonát (Sigma)
- acetát amonný (NH_4 -acetát) (Sigma)
- kyselina trichloroctová (TCA) (P-lab)
- trietanolamin (TEA) (Sigma)
- fenol (Fluka)
- chloroform (Lachema)
- izoamylalkohol (Sigma)
- chlorid sodný (Sigma)
- dihydrogenfosforečnan sodný (NaH_2PO_4) (Sigma)
- hydrogenfosforečnan sodný (Na_2HPO_4) (Sigma)
- paraformaldehyd (Fluka)
- kyselina chlorovodíková (HCl) (Penta)
- acetanhydrid (Sigma)
- 96% etanol (Tanda)
- kvasinková tRNA (Sigma)
- agaróza (Seakem)
- etidiumbromid (Sigma)
- formamid (Sigma)
- mixed-bed resine (Bio-Rad)
- etylendiamintetraoctová kyselina (EDTA) (Sigma)
- hovězí sérový albumin (BSA) (Sigma)

- Ficoll-400 (Sigma)
- PVP-360 (Sigma)
- sodium dodecylsulfát (SDS) (Sigma)
- pyrofosforečnan sodný (NaPPi) (Sigma)
- dithiotreitol (DTT) (Sigma)
- Denhardtův roztok (Sigma) (1x Denhardt's obsahuje 0,02% BSA, 0,02% PVP, 0,02% Ficoll)
- dextran sulfát (Sigma)
- Salmon sperm DNA (10 mg/ml) (Sigma)
- citrát sodný (Sigma)
- trizma base (Sigma)
- vývojka Adefomix (Fomax)
- ustalovač Adefofix (Fomax)
- tri(hydroxymetyl)aminoetan (TRIS) (Sigma)
- RnÁza A (Sigma)
- octan amonný (Sigma)
- cresyl violeť (Sigma)
- histologický balzám DPX (Fluka)
- scintilační roztok Rotiszint eco plus (P-lab)
- xylen (Sigma)

Kity:

MaxiScript in vitro transkripční kit SP6, T7 nebo T3 (Ambion):

- RNA polymeráza T7, T3 a SP6
- 10x transkripční pufr
- ATP, GTP, CTP, UTP (10mM)
- DNÁza I (bez RNáz)
- nanášecí pufr II pro elektroforézu
- H₂O (bez RNáz)
- myší pTRI-aktin (0,5 mg/ml)

4.4.2 PŘÍPRAVA TKÁŇOVÝCH ŘEZŮ

Mláďata byla usmrcena rychlou dekapitací (při slabém červeném světle, jehož intenzita nepřesahovala 1 lux u pokusu, ve kterém byla zvířata chována na LD12:12 nebo při běžném osvětlení u pokusu na LL), celé hlavy (v případě P1) nebo vyjmuté mozky (v případě starších mláďat) byly zamrazeny v suchém ledu a skladovány v -80°C .

Příprava 12 μm koronálních řezů v oblasti SCN na mrazícím mikrotomu Cryocut při -25°C ; přenesení řezů na podložní skla SuperFrost Plus, po zaschnutí skladováno v -80°C .

4.4.3 PŘÍPRAVA ZNAČENÉ cDNA PRÓBY

Pracovní roztoky:

- chloroform/izoamylalkohol (IC): chloroform a izoamylalkohol v poměru 49:1
- fenol/chloroform/izoamylalkohol (PIC): smíchat chloroform a IC v poměru 1:1
- 75% EtOH: 37,5 ml 96% EtOH + DEPC H₂O
- 7,5M NH₄-acetát: 57,81 g NH₄-acetát do 100 ml DEPC H₂O, filtrace přes 0,22 μm filtr
- 5M NH₄-acetát: 38,54 g NH₄-acetát do 100 ml DEPC H₂O, filtrace přes 0,22 μm filtr
- 10% TCA: 20% TCA a DEPC H₂O v poměru 1:1

Metoda:

Pro detekci *Per1* RNA, *Per2* RNA, *Bmal1* RNA a *Rev-erba* RNA v SCN byly použity radioaktivně značené antisense cRNA sondy. Jako radioaktivní značka byl v těchto ribopróbách použit ³⁵S-UTP (1250 mCi/mmol, 10 mCi/ml). Délka antisense cRNA prób a jejich hybridizační teploty jsou uvedeny v tabulce 1:

gen	insert (bp)	linearizační enzym	RNA polymeráza	hybridizační teplota ($^{\circ}\text{C}$)	expozice filmu (dny)
r <i>Bmal1</i>	841	XhoI	T3	58	10
r <i>Per1</i>	980	Sall	T7	60	10
r <i>Per2</i>	1512	Sall	T7	61	10
r <i>Rev-erba</i>	1109	SacII	SP6	60	10

Tabulka 1: Próby pro in situ hybridizaci, jejich délka a hybridizační teplota.

Postup:Linearizace plazmidu (bulk linearizace) pro přípravu antisense cRNA sondy:

do reakce napipetovat:

- plazmid 30 µg
- restrikční pufr 25 µl
- restrikční endonukleáza 25 µl
- celou reakci doplnit ddH₂O do výsledného objemu 250 µl
- inkubovat 4 hodiny při 37°C v termobloku

Analýza na 1% agarózovém gelu.Purifikace linearizovaných plasmidů:

- k 250 µl reakci přidat 250 µl PIC, promíchat, centrifugace 5 minut (18 000 rpm, 4°C)
- k horní vodné fázi přidat 250 µl PIC, promíchat, centrifugovat 5 minut (18 000 rpm, 4°C)
- k horní vodné fázi přidat 250 µl IC, promíchat, centrifugovat 5 minut (18 000 rpm, 4°C)
- k horní vodné fázi přidat 75 µl 10M NH₄-acetátu a 650 µl 96% etanolu (-20°C), promíchat
- precipitace 40 minut v -80°C, centrifugace 20 minut (18 000 rpm, 4°C), odebrat supernatant
- promít peletu 700 µl 75% etanolu (-20°C), centrifugace 20 minut (18 000 rpm, 4°C), zcela odebrat supernatant
- vysušit peletu 15 minut při pokojové teplotě a rozpustit ve 30 µl DEPC H₂O
- kontrola purifikovaného plasmidu elektroforeticky na 1% agarózovém gelu a spektrofotometricky

Radioaktivní značení ribopróby pomocí in vitro transkripce:

do sterilní zkumavky napipetovat:

- DEPC H₂O 5,5 µl
- plazmid 1,5 µl (upravit dle konc. plazmidu, 1 µg do reakce)

- 10x transkripční pufr 2 μ l
- 10mM ATP 1 μ l
- 10mM CTP 1 μ l
- 10mM GTP 1 μ l
- neznačené UTP (200 μ M) 1 μ l
- 35 S-UTP (1250mCi/mmol) 5 μ l
- RNA polymeráza (SP6/T7/T3) 2 μ l
- promíchat pipetou, inkubovat 60 minut při 37°C v termobloku
- přidat 1 μ l DNázy I, inkubovat 20 minut při 37°C v termobloku
- zastavit reakci přidáním 1 μ l sterilní 0,5M EDTA (pH 8,0)
- purifikace radioaktivně značenépróby pomocí kolonek Clontech (Chromaspin), centrifugace (5 min, 700 RCF)
- uložit do dalšího použití v -80°C

Stanovení inkorporace 35 S-UTP:

- k 1 μ l značené ribopróby přidat 19 μ l DEPC H₂O
- připravit Whatman GF/A filtry (Sigma) různého tvaru, 4 ks pro každou ribopróbu
- na každý filtr napipetovat 2 μ l ředěné próby, po zaschnutí 2 filtry vložit do scintilační zkumavky s 10 ml scintilačního roztoku Rotiszint eco plus (= total)
- zbývající filtry – odmytí volných NTPs: promytí 20 ml 10% TCA (4°C), 3x 5 minut
- promytí 20 ml 96% EtOH (4°C), 5 minut
- vysušení filtrů, vložení do 10 ml Rotiszint eco plus scintilačního roztoku (= wash)
- analýza vzorků pomocí scintilačního počítáče, poměr wash cpm / total cpm udává procenta inkorporace 35 S-UTP do cRNA sondy

4.4.4 PREHYBRIDIZACE

Pracovní roztoky:

- DEPC H₂O – 1 ml diethylpyrokarbonátu na 1 litr dH₂O
- DEPC-PBS: 8,77 g NaCl + 0,36 g Na₂HPO₄ v 1 litru DEPC H₂O, pH upravit na 7,4
- 4% PFA: 20 g paraformaldehydu v 500 ml DEPC H₂O, rozpuštěno zahřátím na 65°C, pH upraveno na 7,4; vždy čerstvý roztok
- 0,2N HCl: 16,67 ml HCl (12N, 36,97%) v 1 litru DEPC H₂O

- 0,1M TEA: 18,57 g trietanolaminu v 1 litru DEPC H₂O, pH upravit na 8,0; vždy čerstvý roztok
- pro acetylaci použít 1 ml acet anhydridu na 400 ml TEA
- 70% EtOH: 350 ml 96% EtOH + 130 ml DEPC H₂O

Metoda:

Skla s mozkovými řezy nejprve vyjmuta z -80°C, sušena 20 minut při pokojové teplotě a naskládána do sterilních stojanů. Celý postup probíhá při pokojové teplotě, stojany se skly přemísťovány do kyvet se 400 ml příslušného roztoku.

Postup:

- fixace: 4% PFA v DEPC-PBS, 40 minut
- 2x promytí v DEPC-PBS po 5 minutách
- deproteinace: 0,2N HCl, 5 minut
- promytí v DEPC-PBS, 5 minut
- inkubace v 0,1M TEA, 2 minuty, třepat
- acetylace: 0,25% acet anhydrid v TEA, 10 minut, třepat
- promytí v DEPC-PBS, 5 minut
- dehydratace: 70% EtOH, 5 minut; 96% EtOH, 5 minut
- skla se nechají oschnout při pokojové teplotě a jsou připravena k následné hybridizaci

4.4.5 HYBRIDIZACE

Pracovní roztoky:

- deionizovaný deionizovaný formamid: 50 ml formamidu + 2,5 g mixed bed resine (Bio-Rad), 30 minut míchat, filtrace přes 0,22 µm filtr, uchovávat v -20°C
- 20x SSPE: 40 ml DEPC H₂O + 12,62 g NaCl + 1,66 g NaH₂PO₄ + 2,4 ml EDTA (0,5M, pH 8,0), promíchat, doplnit DEPC H₂O na 60 ml
- 100x Denhardt's: 200 mg BSA + 200 mg Ficoll-400 + 200 mg PVP-360 + 10 ml DEPC H₂O
- kvasinková tRNA: 25 mg tRNA + 1 ml DEPC H₂O

- 10% SDS: 10 g SDS + 100 ml DEPC H₂O, rozpustit zahřátím na 50°C
- 5% NaPPi: 2,5 g pyrofosforečnanu sodného + 50 ml DEPC H₂O, filtrace přes 0,22 µm filtr
- 0,5M DTT: 0,1542 g DTT + 2 ml DEPC H₂O
- hybridizační pufr (HP):
- 25 ml deionizovaný formamid (výsledná koncentrace 10%)
- 5 g dextran sulfát (v.k. 10%)
- 12,5 ml 20x SSPE (v.k. 0,9M NaCl, 50mM NaH₂PO₄, 5mM EDTA)
- 1 ml 100x Denhardt's (v.k. 0,4% BSA, 0,4% Ficoll, 0,4% PVP)
- 1 ml kvasinkové tRNA (25 mg/ml) (v.k. 500 µg/ml)
- 2,5 ml Salmon sperm DNA (10 mg/ml) (v.k. 500 µg/ml)
- 0,5 ml 10% SDS (v.k. 0,1%)
- 1 ml 5% NaPPi (v.k. 0,1%)
- doplnit DEPC H₂O do objemu 50 ml

Metoda:

Postup:

- k 1 ml HP (hybridizační pufr) přidat 100 µl 0,5M DTT, promíchat
- přidat značenou sondu (množství sondy tak, aby výsledná aktivita byla $2,75 \cdot 10^6$ cpm na 1 ml HP)
- denaturace 5 minut při 85°C
- předeheřtí HP na hybridizační teplotu 60°C
- 70 µl HP se sondou nanést na krycí sklíčko, přiložit podložní sklo s řezy
- hybridizace v hybridizačním boxu (vlhčený dvěma uzávěry scintilačních lahvíček naplněnými DEPC-H₂O) zabaleném do alobalu 20-24 hodin při 60°C

4.4.6 POST-HYBRIDIZAČNÍ ODMYTÍ NENAVÁZANÉ PRÓBY

Pracovní roztoky:

- 20x SSC: 175,3 g NaCl + 88,2 g citrát sodný v 1 litru dH₂O, pH upravit na 7,0
- 2x SSC / 0,05% NaPPi / 1mM EDTA: 200 ml 20x SSC + 20 ml 5% NaPPi + 4 ml 0,5M EDTA v 1776 ml dH₂O

- 0,1x SSC / 0,05% NaPPi / 1mM EDTA: 10 ml 20x SSC + 20 ml 0,05% NaPPi + 4 ml 0,5M EDTA v 1996 ml dH₂O
- 1M Tris-HCl: 60,55 g Trizma base + 400 ml dH₂O + 21 ml HCl, pH upravit na 8,0, doplnit dH₂O do 500 ml
- RNázový pufr: 29,2 g NaCl + 990 ml dH₂O + 10 ml tris-HCl (pH 8,0)
- RNáza A (20 mg/ml): 20 mg lyofilizovaná RNáza + 1 ml 10 mM Tris-HCl (pH 7,4), povaření zbaví RNázu stopové DNázové aktivity
- 96% EtOH / 0,3M octan amonný: 9,248 g octan amonný + 400 ml 96% EtOH
- 70% EtOH / 0,3M octan amonný: 9,248 g octan amonný + 292 ml 96% EtOH + 108 ml dH₂O

Metoda:

Postup:

V tkáňových řezech došlo k hybridizaci značené ribopróby s přirozeně transkribovanou mRNA. Přebytková próba byla odstraněna, aby bylo zabráněno její nespecifické vazbě. Ze skel byla opatrně odstraněna krycí sklička odmytím v 2xSSC a byla naskládána do stojanů. Odmývání bylo prováděno v 400ml kyvetách, jednotlivé roztoky jsou uvedeny níže:

- 2x SSC, 30 minut, RT
- RNáza A v pufru (10 µg/ml), 60 minut, 42°C, vodní lázeň
- 2x SSC, 30 minut, RT
- 0,1x SSC, 2x 30 minut, odmývací teplota dle teploty hybridizace (±60°C)
- 0,1x SSC, 2x 20 minut, RT
- 70% EtOH / 0,3M octan amonný, 5 minut, RT
- 96% EtOH / 0,3M octan amonný, 5 minut, RT

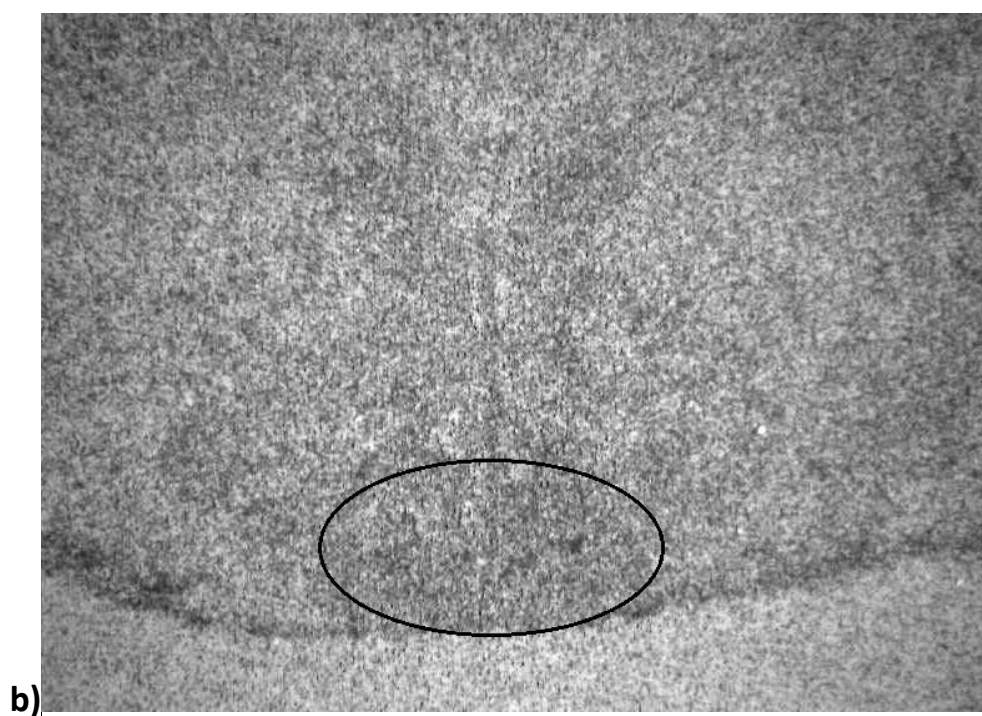
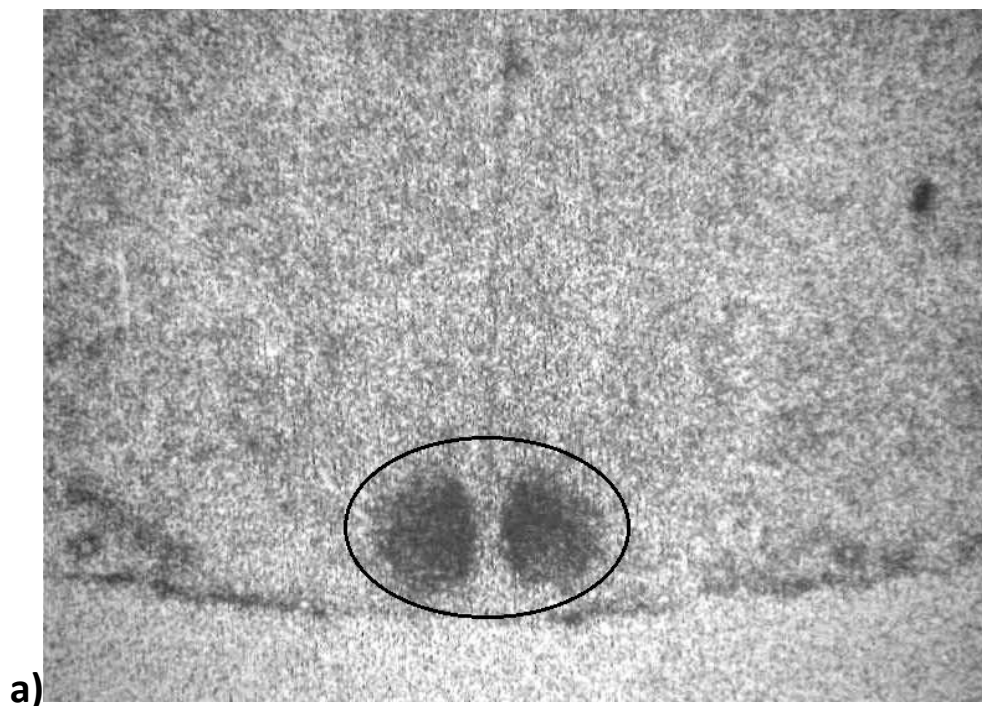
Skla se nechala oschnout a vyskládala se do autoradiografické kazety. Potmě byl na skla přiložen vysokocitlivý film Kodak BioMax MR. Film se nechal exponovat při -20 °C po dobu 10 dní. Filmy byly vyvolány na automatickém přístroji Optimax x-ray processor. Přítomnost a poloha SCN na radiografickém filmu byla detekována pomocí porovnání obrazu na filmu s histologicky obarvenými mozkovými řezy na sklech. Řezy na sklech byly proto obarveny kresylovou violetí a byly z nich připraveny trvalé preparáty. Skla byla obarvena postupně v kyvetách s následujícími roztoky:

- xylene 5 minut
- 95% EtOH 2x 3 minuty
- 70% EtOH 3 minuty
- dH₂O 1 minuta
- 0,25% kresyl-violet 2 minuty
- dH₂O 2x 15 sekund
- CV diferenciál 1 minuta
- 70% EtOH 30 sekund
- 95% EtOH 2x 30 sekund
- xylene 2x 30 sekund

Skla zakápnuta DPX histologickým balzámem a překryta krycím sklíčkem.

4.4.7 ANALÝZA HYBRIDIZAČNÍHO SIGNÁLU

Z každého mozku byl vybrán reprezentativní řez s nejsilnějším signálem, obsahující mediálně-kaudální část SCN (určeno ze skel podbarvených kresyl-violetí), který byl vyhodnocen pomocí digitální analýzy obrazu (program MicroImage, Olympus). Nejprve byl signál na filmu nasnímán černobílou kamerou Sony připojenou na stereomikroskop a poté byla změřena intenzita signálu jako relativní optická denzita (OD). Kromě OD SCN byla vždy změřena i OD pozadí, která pak byla od hodnot OD SCN odečtena. Výsledné hodnoty jsou průměrem OD levého a pravého SCN. Každý časový bod je pak průměrem z 3 – 5ti zvířat. Ukázka filmů na obr. 4.



Obr. 4: Ukázka filmu s SCN s vysokou hladinou genové exprese (a) a filmu s SCN s nízkou hladinou genové exprese (b). SCN jsou vyznačena černou elipsou.

5. STATISTICKÁ ANALÝZA

Data byla vyhodnocena základními statistickými metodami:

- aritmetický průměr: $x = \sum x_i / n$
- směrodatná odchylka: $SD = [(1/n - 1) * \sum (x_i - x)^2]^{1/2}$
- střední chyba průměru: $S.E.M. = SD/n^{1/2}$

Statistická významnost rozdílů hladin mRNA v jednotlivých časových bodech během 24 hodinového cyklu byla analyzována pomocí jednoduché analýzy variance (ANOVA) a následným porovnáním pomocí Student-Newman-Keulsova testu.

Statistická významnost rozdílů v profilech exprese genů mezi kontrolními a pokusnými zvířaty byla analyzována pomocí dvojné analýzy variance (ANOVA) s následným Student-Newman-Keulsovým testem.

Přítomnost cirkadiálního rytmu v expresi vybraných hodinových genů byla testována pomocí cosinorové analýzy. Cosinorová analýza je metoda umožňující testovat hypotézu, že experimentální data lze fitovat na cosinovou křivku pomocí nelineární regrese podle rovnice:

$$Y = \text{mesor} + (\text{amplitude} * \cos(2 * \pi * (X - \text{acrophase}) / \text{wavelength});$$

přičemž mesor je průměrná hodnota dat, kolem které sinusoida osciluje, amplituda je rozdíl mezi maximální hodnotou a průměrem, akrofáze je fáze maxima cosinové křivky a wavelength je definována jako 24 hodin. Analýza umožňuje stanovení hodnot R^2 (goodness of fit) a hladiny významnosti p . Pokud je $p < 0,05$, sledovaný profil odpovídá více cosinové křivce než horizontální linii a vykazuje tak cirkadiální rytmus. Čím více se R^2 blíží hodnotě 1, tím lépe jednotlivé body v profilu odpovídají cosinové křivce.

Pro posouzení významnosti rozdílu fáze dvou porovnávaných profilů byla stanovena následující kritéria: 1) Dvojná analýza variance musí prokázat signifikantní rozdíl mezi oběma profily (tj. významný rozdíl mezi skupinami nebo signifikantní interakční efekt) a 2) Akrofáze stanovené pomocí cosinorové analýzy musí vykazovat signifikantní rozdíl pomocí Studentova t -testu ($p < 0,05$).

6. VÝSLEDKY

6.1 VLIV PRENATÁLNÍHO NASTAVENÍ HODIN V SCN NA JEJICH VÝVOJ BĚHEM ČASNÉHO POSTNATÁLNÍHO OBDOBÍ

Denní profily exprese *Per1*, *Per2*, *Bmal1* a *Rev-erba* byly stanoveny pomocí *in-situ* hybridizace v SCN dvou skupin desetidenních mláďat, která byla od narození vychovávána náhradní matkou chovanou na opačném světelném režimu, než jejich vlastní matka (postup viz 4.2.1). Mláďata narozená matkám chovaným na LD12:12 a po narození vychovávána náhradní matkou na DL12:12 jsou označena jako skupina 1 a mláďata narozená matkám chovaným na DL12:12 a po narození vychovávána náhradní matkou na LD12:12 jsou označena jako skupina 2.

6.1.1 *Per1 mRNA*

Porovnání profilů exprese genu *Per1* v SCN u obou skupin mláďat pomocí dvojné analýzy variance prokázalo statisticky významný vliv času ($F = 104,117$; $p < 0,001$), ne však statisticky významný rozdíl mezi oběma skupinami ($F = 0,0640$; $p = 0,801$). Mezi oběma skupinami nebyl signifikantní efekt interakce mezi časem a skupinami ($F = 0,915$; $p = 0,491$) (obr. 5).

6.1.2 *Per2 mRNA*

Porovnání profilů exprese genu *Per2* v SCN u obou skupin mláďat pomocí dvojné analýzy variance prokázalo statisticky významný vliv času ($F = 389,642$; $p < 0,001$), ne však statisticky významný rozdíl mezi oběma skupinami ($F = 0,229$; $p = 0,634$). Mezi oběma skupinami nebyl signifikantní efekt interakce mezi časem a skupinami ($F = 2,070$; $p = 0,072$) (obr. 6).

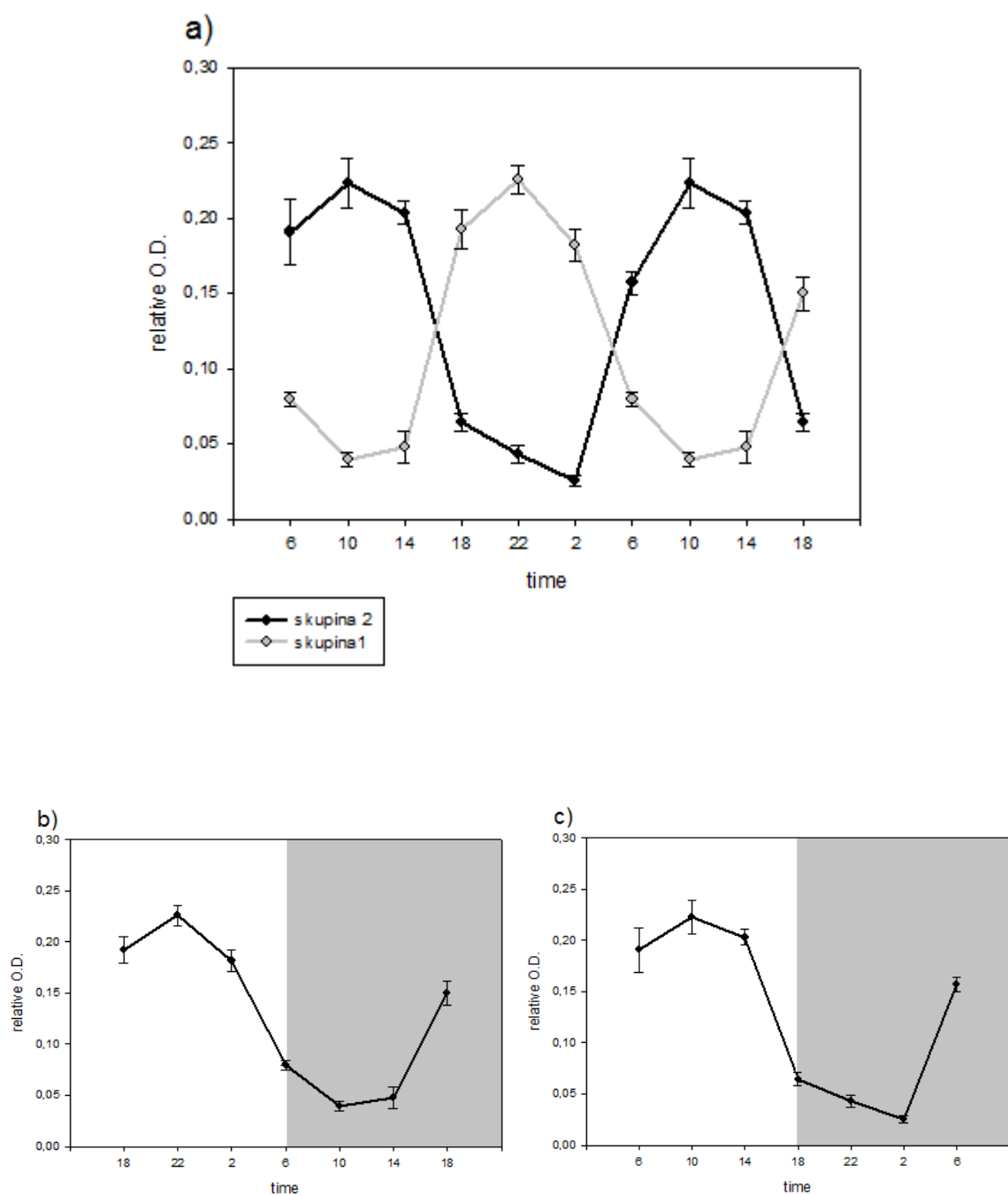
6.1.3 *Bmal1 mRNA*

Porovnání profilů exprese genu *Bmal1* v SCN u obou skupin mláďat pomocí dvojné analýzy variance prokázalo statisticky významný vliv času ($F = 29,098$; $p < 0,001$), ne však statisticky významný rozdíl mezi oběma skupinami ($F = 1,971$; $p = 0,166$). Mezi oběma

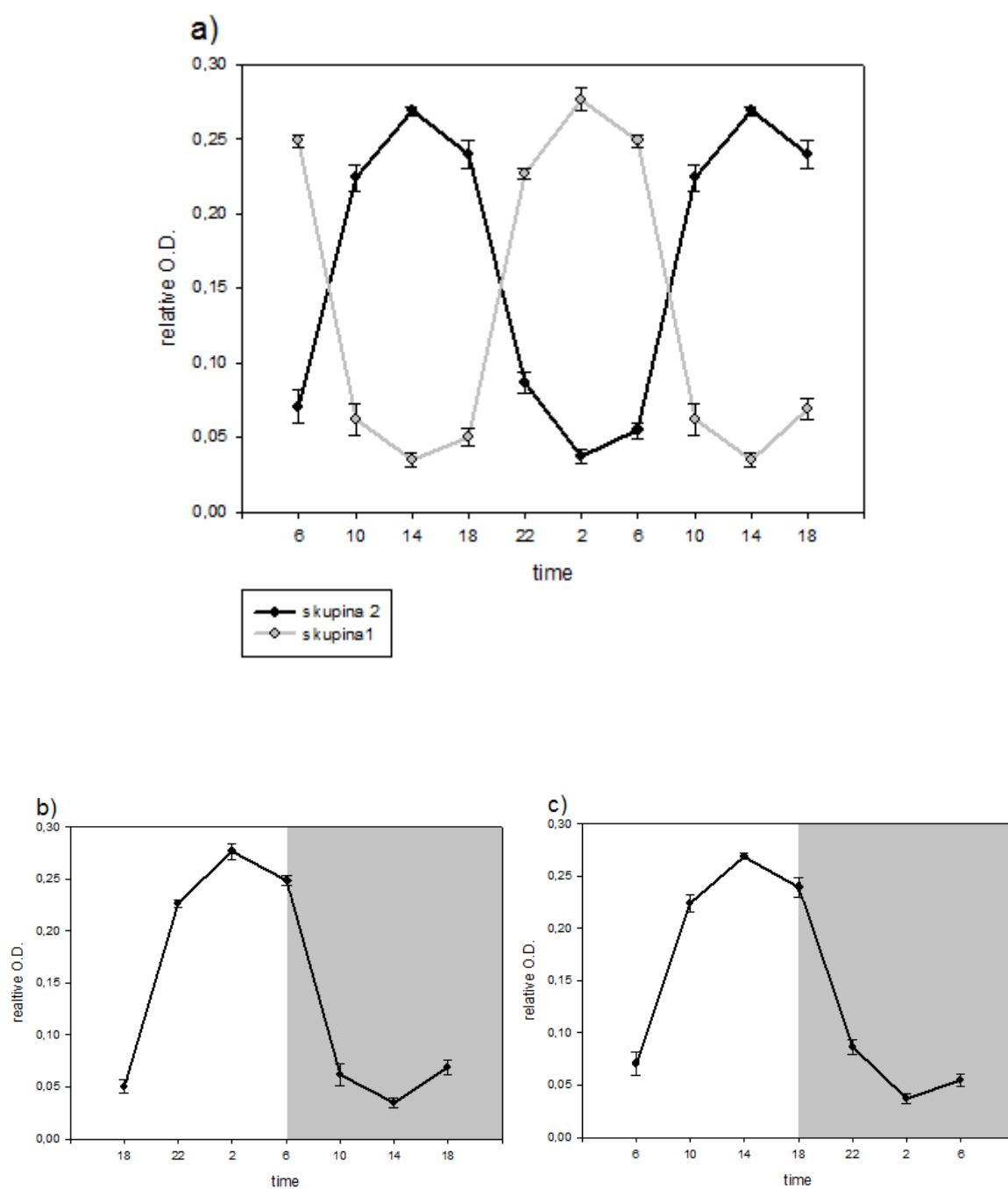
skupinami nebyl signifikantní efekt interakce mezi časem a skupinami ($F = 0,864$; $p = 0,527$) (obr. 7).

6.1.4 *Rev-erba* mRNA

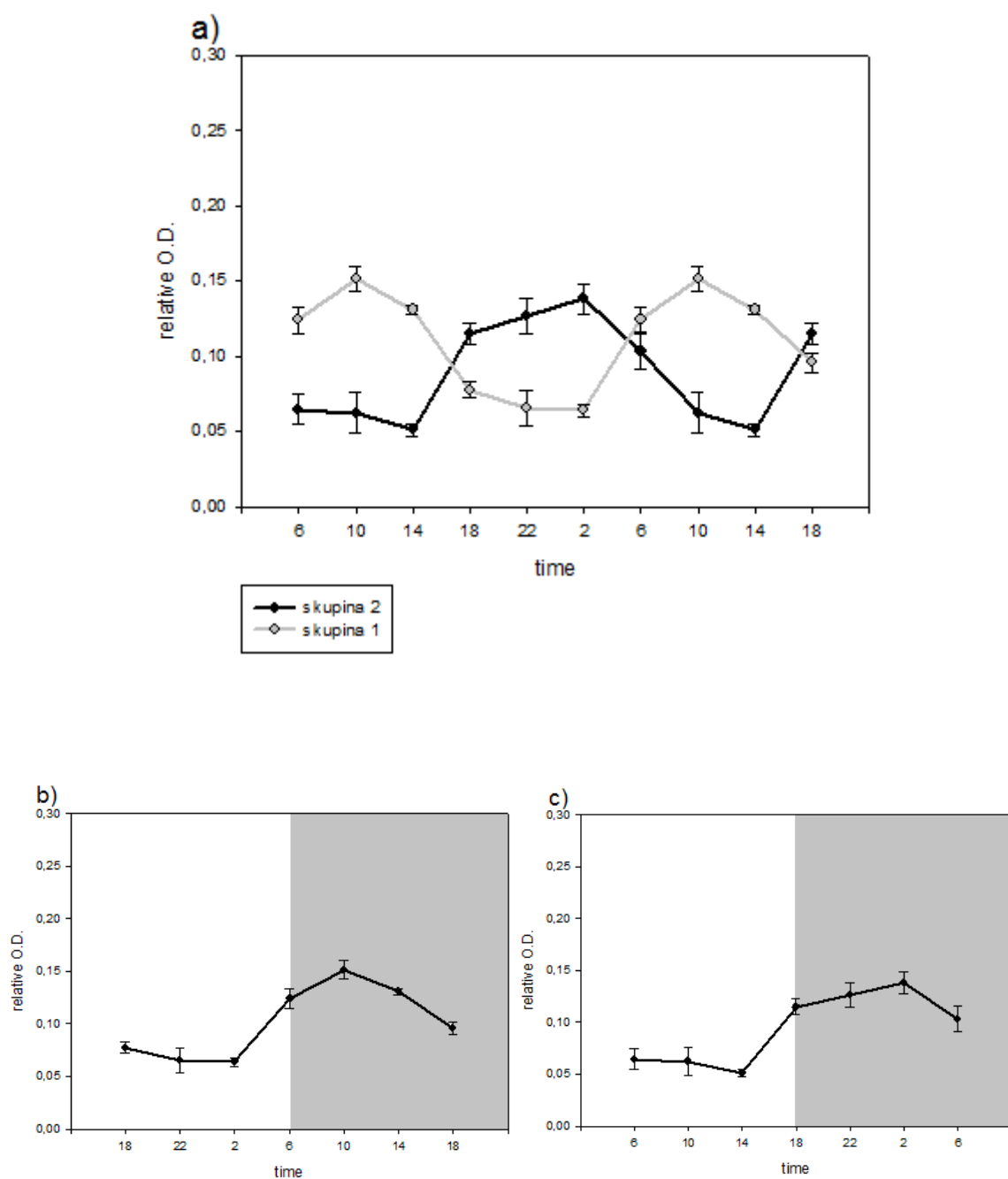
Porovnání profilů exprese genu *Rev-erba* v SCN u obou skupin mláďat pomocí dvojné analýzy variance prokázalo statisticky významný vliv času ($F = 128,942$; $p < 0,001$), ne však statisticky významný rozdíl mezi oběma skupinami ($F = 2,090$; $p = 0,154$). Mezi oběma skupinami nebyl signifikantní efekt interakce mezi časem a skupinami ($F = 1,147$; $p = 0,348$) (obr. 8).



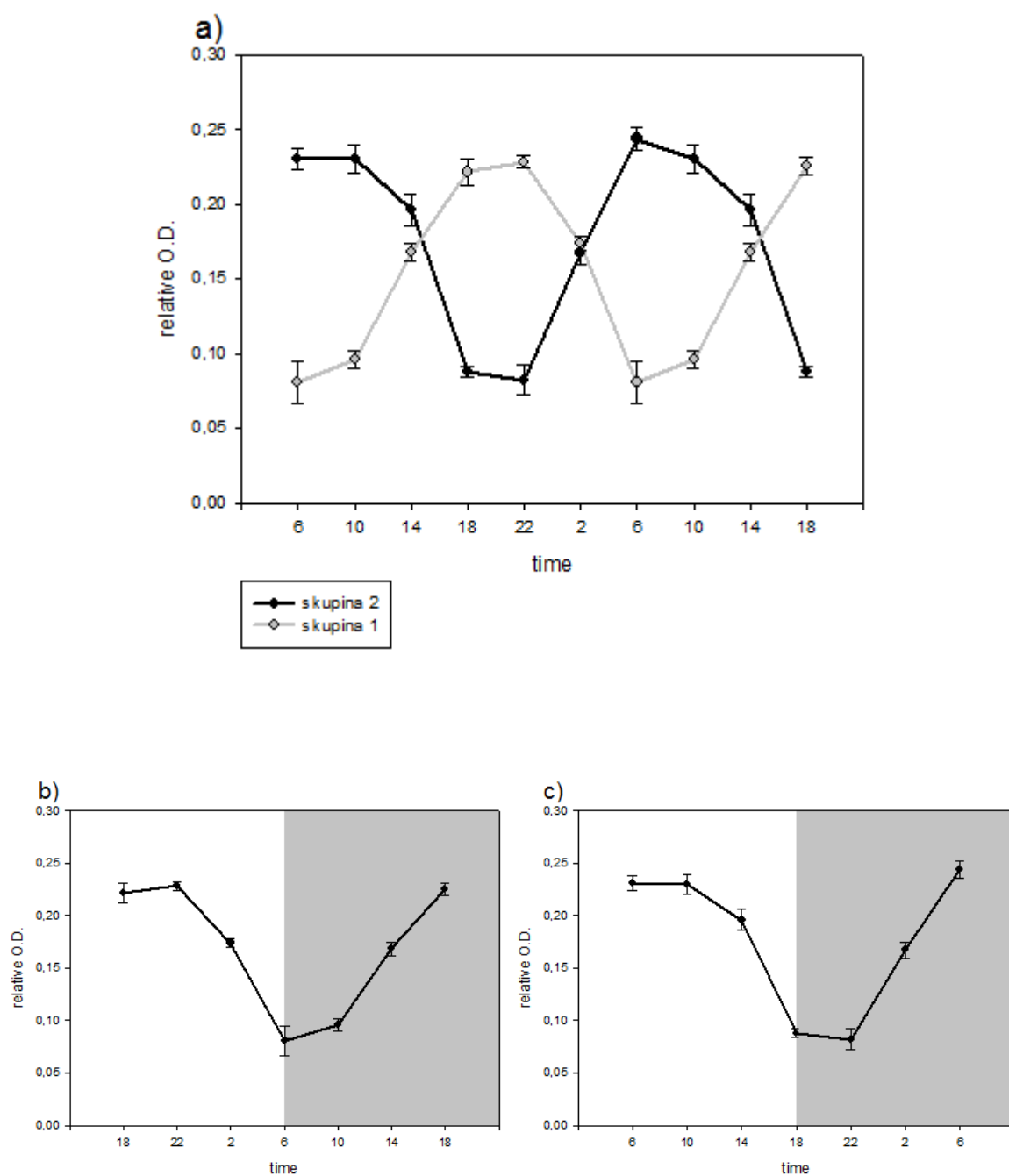
Obr. 5: Denní profily hladin *Per1* mRNA a) společný graf pro skupinu 1 a skupinu 2, b) skupina 1, c) skupina 2. Na ose x je znázorněn reálný čas, na ose y relativní optická densita. Data v každém časovém bodě představují průměr z 4-5 zvířat \pm S.E.M.



Obr. 6: Denní profily hladin *Per2* mRNA a) společný graf pro skupinu 1 a skupinu 2, b) skupina 1, c) skupina 2. Na ose x je znázorněn reálný čas, na ose y relativní optická densita. Data v každém časovém bodě představují průměr z 4-5 zvířat \pm S.E.M.



Obr. 7: Denní profily hladin Bmal1 mRNA a) společný graf pro skupinu 1 a skupinu 2, b) skupina 1, c) skupina 2. Na ose x je znázorněn reálný čas, na ose y relativní optická denzita. Data v každém časovém bodě představují průměr z 4-5 zvířat \pm S.E.M.



Obr. 8: Denní profily hladin Rev-erba mRNA a) společný graf pro skupinu 1 a skupinu 2, b) skupina 1, c) skupina 2. Na ose x je znázorněn reálný čas, na ose y relativní optická denzita. Data v každém časovém bodě představují průměr z 4-5 zvířat \pm S.E.M.

Souhrn výsledků:

Porovnání profilů exprese všech sledovaných genů (*Per1*, *Per2*, *Bmal1* a *Rev-erba*) v SCN u obou skupin mláďat pomocí dvojné analýzy variance prokázalo statisticky významný vliv času ($p < 0,001$), ne však statisticky významný rozdíl mezi oběma skupinami ($p > 0,05$), ani významný efekt interakce mezi skupinami. Výsledky tak prokázaly, že profily exprese všech sledovaných hodinových genů v SCN obou skupin mláďat se do 10. dne po narození plně přizpůsobily ke světelným režimům jejich náhradních matek.

6.2 Vliv stálého světla a změny režimu v příjmu potravy matky na vývoj rytmické exprese vybraných hodinových genů v SCN jejich mláďat

Denní profily exprese *Per2*, *Bmal1* a *Rev-erba* byly měřeny v SCN mláďat ve věku P10 a P20, jejichž matky byly chovány na LL od zabřeznutí a měly i) přístup k potravě *ad libitum* (skupina 1) a ii) omezený přístup k potravě od porodu (skupina 2) (postup viz 4.2.2).

6.2.1 Vliv LL a omezení doby příjmu potravy matek na cirkadiánní profil hodinových genů v SCN mláďat v P10

6.2.1.1 *Per2* mRNA

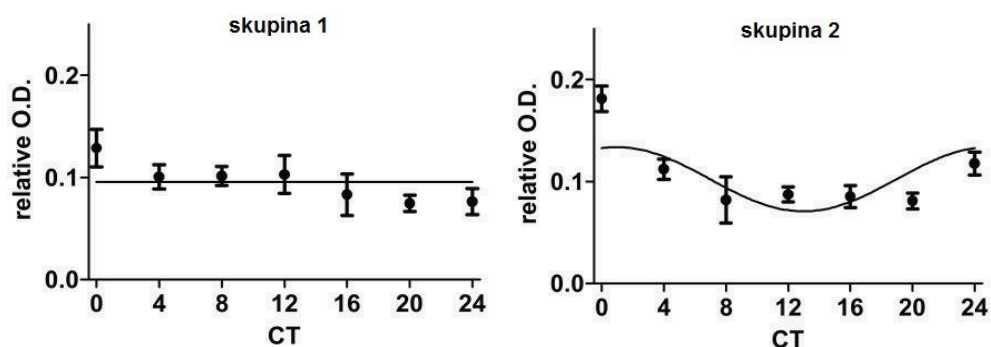
Porovnání profilů exprese genu *Per2* obou skupin mláďat pomocí dvojné analýzy variance prokázalo statisticky významný vliv času ($F = 6,766$; $p < 0,001$), ne však statisticky významný rozdíl mezi oběma skupinami ($F = 2,326$; $p = 0,133$). Interakční efekt mezi časem a skupinami také nebyl statisticky významný ($F = 1,897$; $p = 0,097$). Cosinorová analýza prokázala signifikantní rytmus v expresi genu *Per2* u skupiny 2 ($R^2 = 0,3059$; $p = 0,0029$), na rozdíl od skupiny 1, kde exprese rytmická nebyla ($R^2 = 0,05896$; $p = 0,3782$) (obr. 9).

6.2.1.2 *Bmal1* mRNA

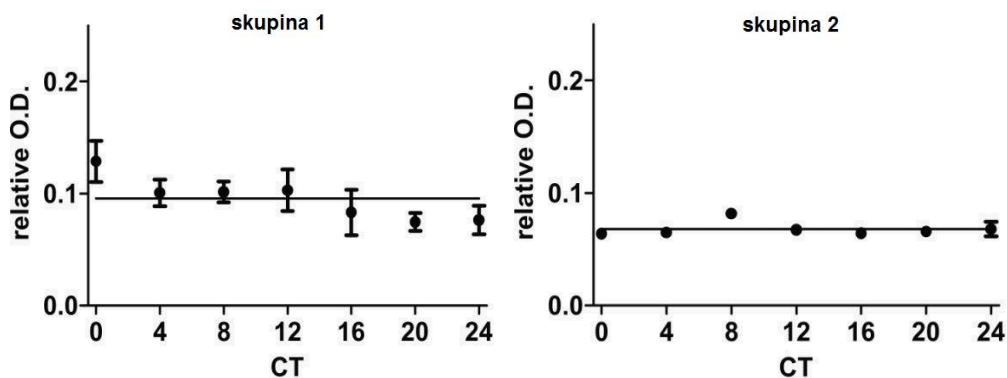
Porovnání profilů exprese genu *Bmal1* obou skupin mláďat pomocí dvojné analýzy variance neprokázalo statisticky významný vliv času ($F = 1,705$; $p = 0,137$), avšak statisticky významný rozdíl byl mezi oběma skupinami ($F = 21,945$; $p < 0,001$). Interakční efekt mezi časem a skupinami nebyl statisticky významný ($F = 1,650$; $p = 0,151$). Cosinorová analýza ani u jedné skupiny neprokázala signifikantní rytmus v genové expresi (skupina 1: $R^2 = 0,05896$; $P = 0,3782$; skupina 2: $R^2 = 0,132$; $P = 0,1038$) (obr.10).

6.2.1.3 *Rev-erba mRNA*

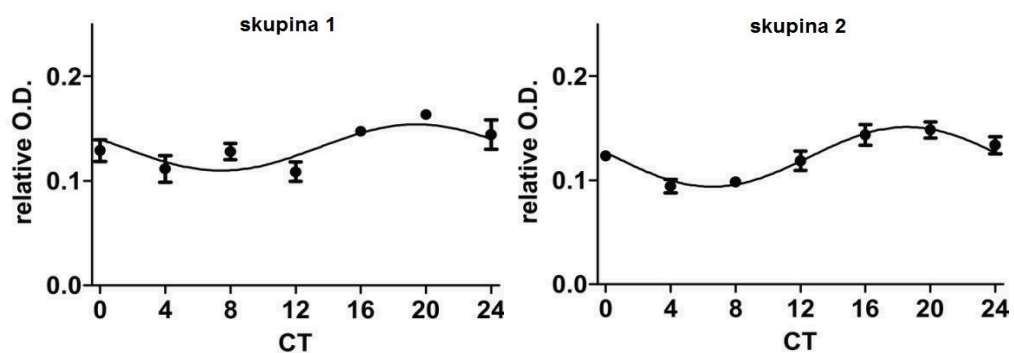
Porovnání profilů exprese genu *Rev-erba* obou skupin mláďat pomocí dvojné analýzy variance prokázalo statisticky významný vliv času ($F = 10,150$; $p < 0,001$) a také statisticky významný rozdíl byl mezi oběma skupinami ($F = 4,927$; $p = 0,031$). Interakční efekt mezi časem a skupinami nebyl statisticky významný ($F = 1,071$; $p = 0,391$). Cosinorová analýza prokázala pro obě skupiny signifikantní rytmus v expresi genu *Rev-erba* (skupina 1: $R^2 = 0,3089$; $P = 0,0027$; skupina 2: $R^2 = 0,6133$; $P < 0,0001$) (obr. 11).



Obr. 9: Denní profily hladin *Per2* mRNA. Vlevo data proložená sinusoidní křivkou pomocí cosinorové metody pro skupinu 1, vpravo pro skupinu 2. Na ose x je znázorněn čas v CT (cirkadiánní čas), na ose y relativní optická denzita. Data v každém časovém bodě představují průměr z 4-5 zvířat \pm S.E.M.



Obr. 10: Denní profily hladin *Bmal1* mRNA. Vlevo data proložená sinusoidní křivkou pomocí cosinorové metody pro skupinu 1, vpravo pro skupinu 2. Na ose x je znázorněn čas v CT (cirkadiánní čas), na ose y relativní optická denzita. Data v každém časovém bodě představují průměr z 4-5 zvířat \pm S.E.M.



Obr. 11: Denní profily hladin *Rev-erba* mRNA. Vlevo data proložená sinusoidní křivkou pomocí cosinorové metody pro skupinu 1, vpravo pro skupinu 2. Na ose x je znázorněn čas v CT (cirkadiánní čas), na ose y relativní optická denzita. Data v každém časovém bodě představují průměr z 4-5 zvířat \pm S.E.M.

Souhrn výsledků:

Výsledky prokázaly, že u mláďat v P10 vychovávaných matkami na LL, které byly krmeny *ad libitum* (skupina 1) byl v SCN slabě signifikantní pouze rytmus v expresi genu *Rev-erba*, zatímco u mláďat vychovávaných na LL matkami, které byly vystaveny pravidelnému režimu v příjmu potravy (skupina 2), vykazovaly signifikantní cirkadiální rytmus profily exprese hodinových genů *Per2* a *Rev-eb α*. Rytmus v expresi *Rev-erba* byl u skupiny 2 více signifikantní a R^2 bylo vyšší než u skupiny 1. Exprese hodinového genu *Bmal1* nebyla rytmická ani u jedné skupiny mláďat.

6.2.2 VLIV LL a OMEZENÍ DOBY PŘÍJMU POTRAVY MATEK NA CIRKADIÁNNÍ PROFIL HODINOVÝCH GENŮ V SCN U MLÁĎAT V P20

6.2.2.1 *Per2* mRNA

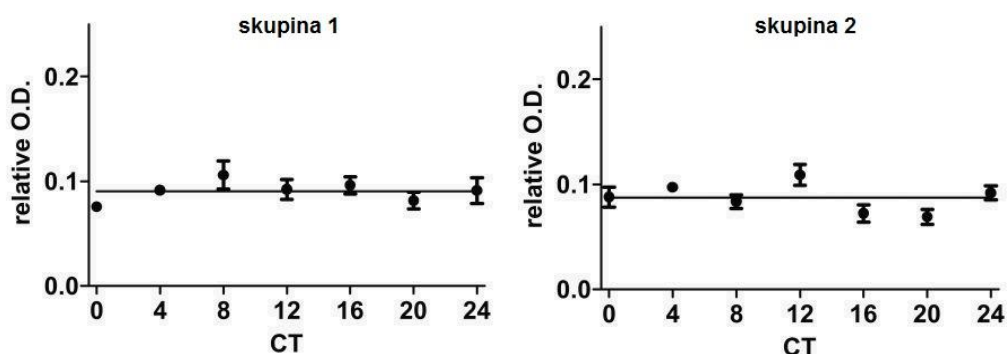
Porovnání profilů exprese genu *Per2* obou skupin mláďat pomocí dvojné analýzy variance neprokázalo statisticky významný vliv času ($F = 2,219$; $p = 0,054$) ani statisticky významný rozdíl byl mezi oběma skupinami ($F = 0,527$; $p = 0,471$). Interakční efekt mezi časem a skupinami nebyl statisticky významný ($F = 1,901$; $p = 0,097$). Cosinorová analýza neprokázala signifikantní rytmus v expresi genu *Per2* ani u jedné skupiny (skupina 1: $R^2 = 0,1174$, $p = 0,1357$; skupina 2: $R^2 = 0,1508$; $p = 0,0731$) (obr. 12).

6.2.2.2 *Bmal1* mRNA

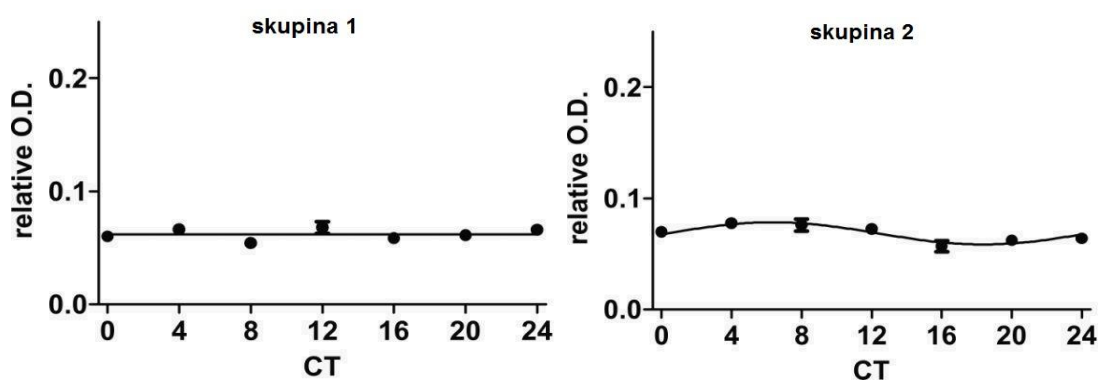
Porovnání profilů exprese genu *Bmal1* obou skupin mláďat pomocí dvojné analýzy variance prokázalo statisticky významný vliv času ($F = 2,728$; $p = 0,022$) a statisticky významný rozdíl byl i mezi oběma skupinami ($F = 8,479$; $p = 0,005$). Interakční efekt mezi časem a skupinami nebyl statisticky významný ($F = 2,230$; $p = 0,054$). Cosinorová analýza prokázala signifikantní rytmus v expresi genu *Bmal1* u skupiny 2 ($R^2 = 0,3637$; $p = 0,0007$), zatímco u skupiny 1 exprese rytmická nebyla ($R^2 = 0,003533$; $p = 0,9466$) (obr. 13).

6.2.2.3 *Rev-erba* mRNA

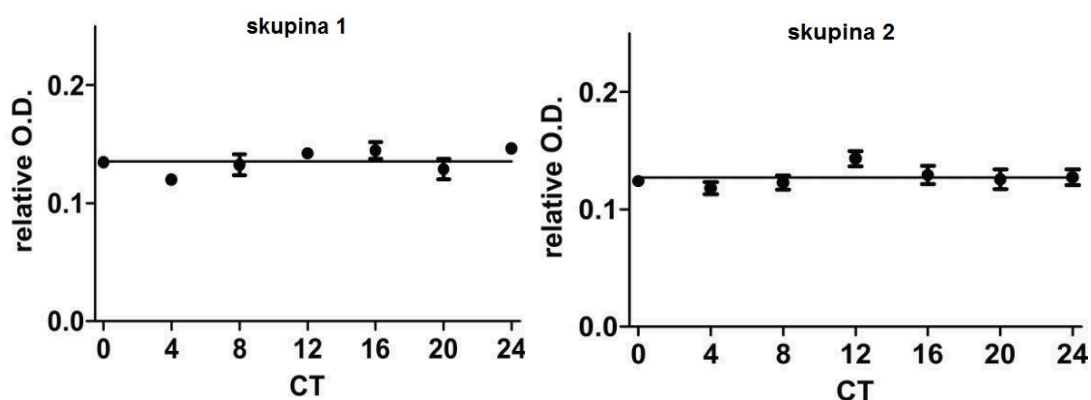
Porovnání profilů exprese genu *Rev-erba* obou skupin mláďat pomocí dvojné analýzy variance prokázalo statisticky významný vliv času ($F = 2,923$; $p = 0,015$) a statisticky významný rozdíl byl i mezi oběma skupinami ($F = 5,842$; $p = 0,019$). Interakční efekt mezi časem a skupinami nebyl statisticky významný ($F = 0,635$; $p = 0,702$). Cosinorová analýza neprokázala rytmus v expresi genu *Rev-erba* ani u jedné ze skupin (skupina 1 – $R^2 = 0,08494$; $p = 0,2526$; skupina 2 – $R^2 = 0,1195$; $p = 0,1306$) (obr. 14).



Obr. 12: Denní profily hladin *Per2* mRNA. Vlevo data proložená sinusoidní křivkou pomocí cosinorové metody pro skupinu 1, vpravo pro skupinu 2. Na ose x je znázorněn čas v CT (cirkadiánní čas), na ose y relativní optická denzita. Data v každém časovém bodě představují průměr z 4-5 zvířat \pm S.E.M.



Obr. 13: Denní profily hladin *Bmal1* mRNA. Vlevo data proložená sinusoidní křivkou pomocí cosinorové metody pro skupinu 1, vpravo pro skupinu 2. Na ose x je znázorněn čas v CT (cirkadiánní čas), na ose y relativní optická denzita. Data v každém časovém bodě představují průměr z 4-5 zvířat \pm S.E.M.



Obr. 14: Denní profily hladin *Rev-erba* mRNA. Vlevo data proložená sinusoidní křivkou pomocí cosinorové metody pro skupinu 1, vpravo pro skupinu 2. Na ose x je znázorněn čas v CT (cirkadiánní čas), na ose y relativní optická denzita. Data v každém časovém bodě představují průměr z 4-5 zvířat \pm S.E.M.

Souhrn výsledků:

Výsledky prokázaly, že profily exprese hodinových genů *Per2*, *Bmal1* a *Rev-erba* v SCN u mláďat v P20 vychovávaných matkami na LL, které byly krmeny *ad libitum* (skupina 1), nevykazovaly významné cirkadiánní rytmy. V případě mláďat vychovávaných matkami na LL a vystavených pravidelnému režimu v příjmu potravy (skupina 2), byl signifikantní pouze rytmus v expresi genu *Bmal1*, avšak amplituda tohoto rytmu byla jen velmi nízká. Exprese ostatních sledovaných genů cirkadiánní rytmus nevykazovaly.

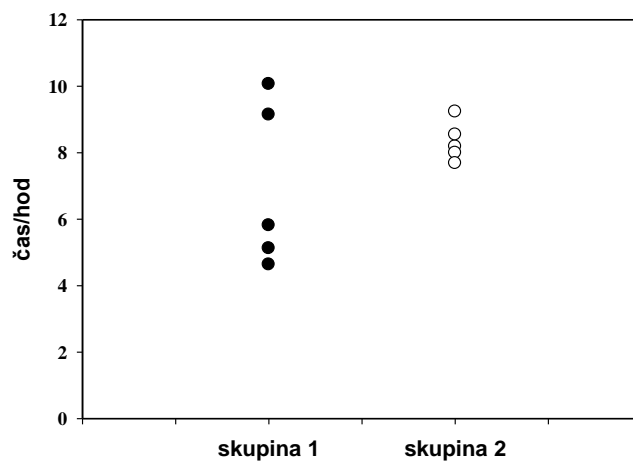
6.2.3 VLIV LL A OMEZENÍ DOBY PŘÍJMU POTRAVY MATEK NA RYTMUS V POHYBOVÉ AKTIVITĚ MLÁĎAT

Cílem této části práce bylo zjistit, jak experimentální podmínky popsané v pokuse 6.2 ovlivní rytmus v pohybové aktivitě mláďat po odstavu. Mláďata, jejichž matky byly chovány na LL a měly přístup k potravě *ad libitum*, byla označena jako skupina 1 ($n = 5$) a mláďata, jejichž matky byly chovány na LL a měly pravidelný přístup k potravě, jako skupina 2 ($n = 5$). Mláďata byla po odstavu vypuštěna do DD a jejich pohybová aktivita byla měřena pomocí CAMS (Circadian Activity Monitoring System, INSERM, Francie).

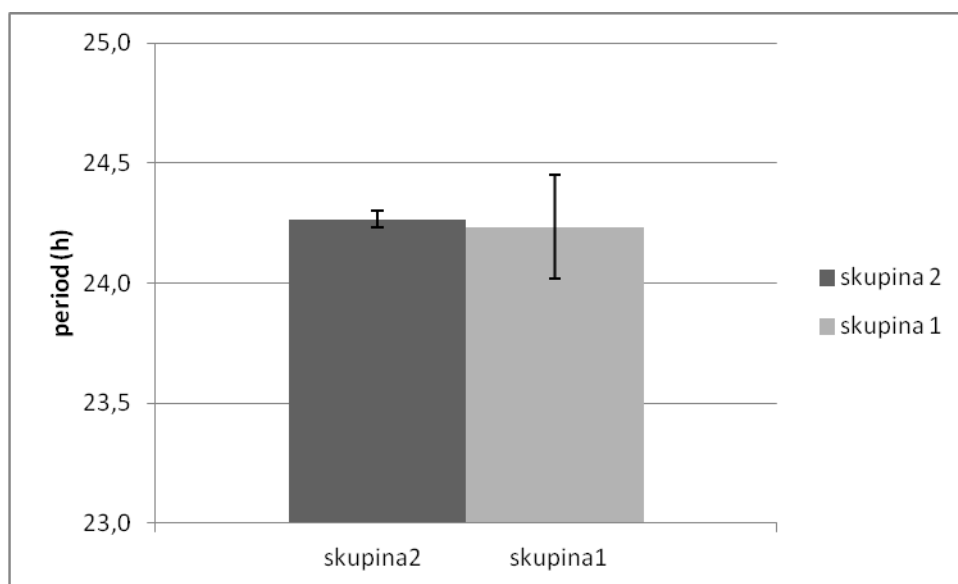
Po vypuštění do stálé tmy začala mláďata vykazovat rytmickou pohybovou aktivitu, která běžela se svou vnitřní periodou. Mláďata ze skupiny 1 (obr. 15) začala vykazovat rytmus v pohybové aktivitě významně později ve srovnání s mláďaty ze skupiny 2 (obr. 16), jelikož během prvních deseti dnů po vypuštění na DD byl u nich významně nižší poměr aktivity měřený během subjektivní noci a subjektivního dne. Rozdíl mezi poměrem u skupiny 1 ($1,487 \pm 0,265$) byl signifikantně nižší ve srovnání s poměrem u skupiny 2 ($2,026 \pm 0,308$) na hladině významnosti $p < 0,05$ ($p = 0,018$). Výsledek prokázal, že rytmus v pohybové aktivitě byl u skupiny 2 během prvních deseti dnů lépe definovaný než u skupiny 1. V pozdějším období již nebyl rozdíl mezi oběma skupinami mláďat signifikantní.

Experimentální podmínky, za kterých byla mláďata během časně ontogeneze vychovávána, také ovlivnily fázi, ve které se nacházely jejich cirkadiánní hodiny v době odstavu. Tato fáze byla určena na základě denní doby, od které začínal jednotlivým mláďatům subjektivní den, neboli končila jejich pohybová aktivita. Zatímco ve skupině 1 nebyl počátek subjektivního dne u jednotlivých mláďat vzájemně synchronizován do stejné fáze, u mláďat skupiny 2 byl prokázán vysoký stupeň vzájemné synchronizace (graf 1).

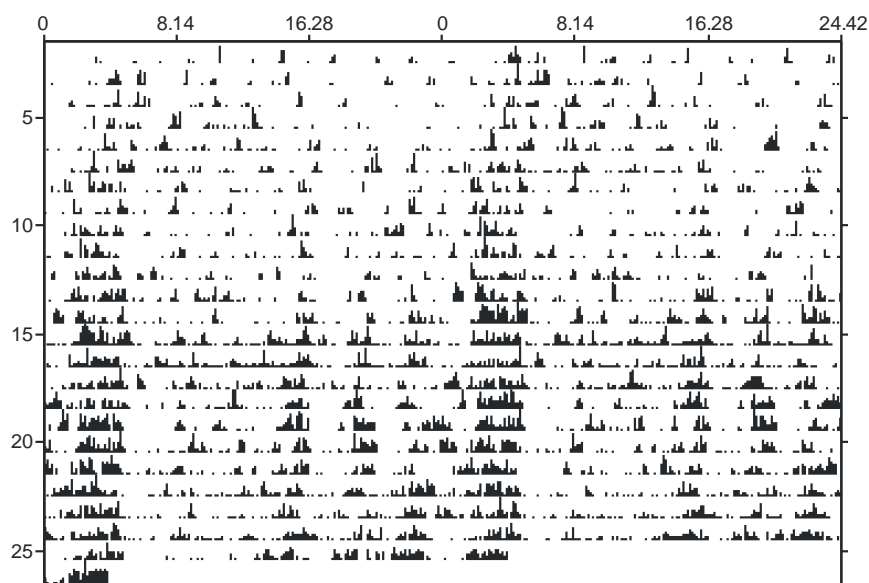
Kromě toho vykazovala vnitřní perioda τ u skupiny 1 ($24,233 \pm 0,216$ hod) výrazně větší variabilitu, jelikož byl u této skupiny větší rozptyl v jejich hodnotách než u skupiny 2 ($24,267 \pm 0,037$ hod) (graf 2).



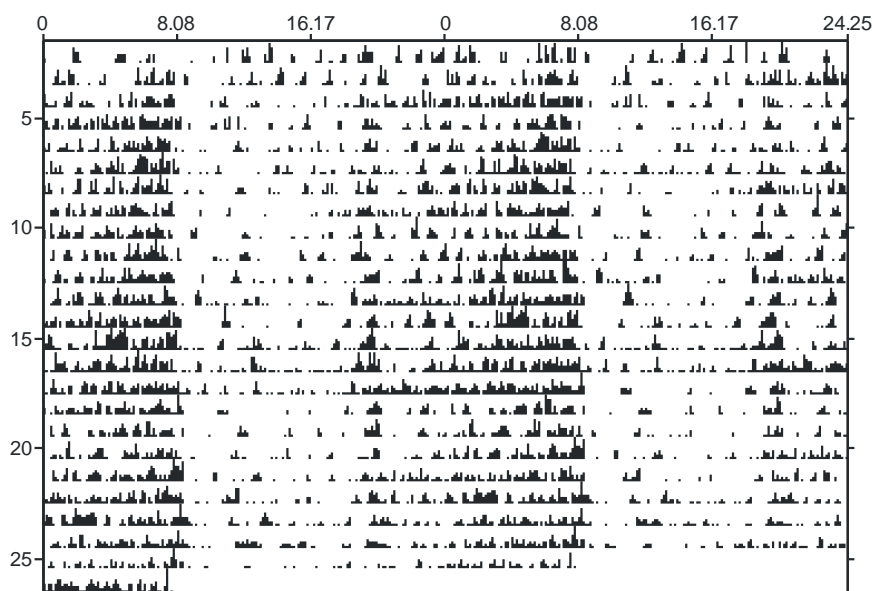
Graf 1: Denní doba nástupu subjektivního dne u jednotlivých mláďat. Vlevo jsou zobrazena data pro skupinu 1, vpravo pro skupinu 2. Na ose y je vyjádřen začátek subjektivního dne jako denní doba, kdy mláďata přestala být aktivní.



Graf 2: Délka vnitřní periody τ . Tmavý sloupec zobrazuje data pro skupinu 2, světlý sloupec pro skupinu 1. Na ose y je vyjádřena délka vnitřní periody τ v hodinách. Data představují průměr z 5ti zvířat \pm S.D.



Obr. 15: Reprezentativní záznam pohybové aktivity na DD mláděte ze skupiny 1. Na horní liště je znázorněna délka jeho vnitřní periody τ . Na ose y počet dní na DD. Na aktogramu jsou pro lepší názornost na jednom řádku znázorněny vždy 2 po sobě jdoucí dny začínající v 00:00, následující den je vždy replotován na dalším řádku.



Obr. 16: Reprezentativní záznam pohybové aktivit mláděte na DD ze skupiny 2. Na horní liště je znázorněna délka jeho vnitřní periody τ . Na ose y počet dní na DD. Na aktogramu jsou pro lepší názornost na stejném řádku znázorněny vždy 2 po sobě jdoucí dny začínající v 00:00, následující den je vždy replotován na dalším řádku.

Po ukončení monitorování pohybové aktivity v DD byla zvířata dva měsíce chována na režimu LD 12:12 a následně opět vypuštěna do DD a opět u nich byla sledována jejich pohybová aktivita. Cílem bylo zjistit, zda rozdíly mezi oběma skupinami naměřené ihned po odstavu přetrvávají i poté, co se jejich centrální hodiny synchronizovaly delší dobu na světelném režimu. Při opětovném vypuštění do DD však nebyl shledán žádný rozdíl mezi skupinami.

Souhrn výsledků:

Výsledky prokázaly rozdíly v rytmech pohybové aktivity mezi oběma skupinami mláďat. Rytmus pohybové aktivity mláďat, jejichž matky byly na LL vystaveny pravidelnému režimu v příjmu potravy, byl přítomen dříve, byl u jednotlivých mláďat navzájem synchronizován do stejné fáze a délka jejich vnitřní periody τ byla méně variabilní než v případě mláďat skupiny 1, jejichž matky byly chovány na LL a krmeny *ad libitum*.

6.3 VÝVOJ DENNÍCH PROFILŮ EXPRESE VYBRANÝCH HODINOVÝCH GENŮ V SCN U MLÁDAT POTKANA KMENE SHR

Cílem této části práce bylo zjistit, jak se vyvíjejí rytmy v expresi hodinových genů *Per1*, *Per2*, *Bmal1* a *Rev-erba* v SCN mládat potkana kmene SHR. Expresi hodinových genů byla měřena u mládat ve věku P1, P10, P20 a P30, jejichž matky byly chovány za standardních světelných podmínek LD 12-12 a měly přístup k vodě i krmení *ad libitum*. Hladiny mRNA v SCN byly stanovovány pomocí *in-situ* hybridizace.

6.3.1 *Per1* mRNA

Ve všech sledovaných věkových skupinách prokázala jednoduchá analýza variance statisticky významný rozdíl v hladinách *Per1* mRNA mezi jednotlivými časovými body (P1: $F = 20,970$, $p < 0,001$; P10: $F = 56,402$, $p < 0,001$; P20: $F = 104,419$, $p < 0,001$; P30: $F = 70,767$, $p < 0,001$). Cosinorová analýza pro jednotlivé věky mládat prokázala signifikantní rytmus exprese genu *Per1* ve všech případech (P1: $p < 0,0001$, $R^2 = 0,6783$; P10: $p < 0,0001$, $R^2 = 0,8408$; P20: $p < 0,0001$, $R^2 = 0,8983$; P30: $p < 0,0001$, $R^2 = 0,8678$). Amplituda genové exprese byla v P1 ještě nízká, ale v P10 už dosáhla úrovně dospělého jedince (P1: 0,03766, P10: 0,07038, P20: 0,07705, P30: 0,05861). Rozdíl mezi amplitudami exprese genu *Per1* skupin P1 a P10 byl statisticky významný ($p < 0,001$) (obr.17).

Porovnání profilů exprese genu *Per1* mezi jednotlivými věkovými skupinami mládat pomocí dvojné analýzy variance prokázalo statisticky významný vliv času ($F = 215,019$; $p < 0,001$) i statisticky významný rozdíl mezi skupinami ($F = 19,749$; $p < 0,001$). Interakční efekt mezi časem a skupinami byl statisticky významný ($F = 6,199$; $p < 0,001$).

6.3.2 *Per2* mRNA

Jednoduchá analýza variance prokázala statisticky významný rozdíl v hladinách *Per2* mRNA mezi jednotlivými časovými body u všech věkových skupin (P1: $F = 37,363$, $p < 0,001$; P10: $F = 67,215$, $p < 0,001$; P20: $F = 103,963$, $p < 0,001$; P30: $F = 79,446$, $p < 0,001$). Cosinorová analýza pro jednotlivé skupiny prokázala signifikantní rytmus exprese genu *Per2* ve všech případech (P1: $p < 0,0001$, $R^2 = 0,8756$; P10: $p < 0,0001$, $R^2 = 0,9225$; P20: $p < 0,0001$, $R^2 = 0,9243$; P30: $p < 0,0001$, $R^2 = 0,9338$). Amplituda opět

s věkem vzrostla a v P10 dosáhla úrovně dospělého jedince (P1: 0,036, P10: 0,06588, P20: 0,06582, P30: 0,06553). Rozdíl mezi amplitudami exprese genu *Per2* skupin P1 a P10 byl statisticky významný ($p < 0,001$) (obr.18).

Porovnání profilů exprese genu *Per2* mezi jednotlivými věkovými skupinami mláďat pomocí dvojné analýzy variance prokázalo statisticky významný vliv času ($F = 268,326$; $p < 0,001$) i statisticky významný rozdíl mezi skupinami ($F = 4,175$, $p = 0,008$). Interakční efekt mezi časem a skupinami byl statisticky významný ($F = 6,404$, $p < 0,001$).

6.3.3 *Bmal1* mRNA

Jednoduchá analýza variance prokázala statisticky významný rozdíl v hladinách *Bmal1* mRNA mezi jednotlivými časovými body u všech věkových skupin (P1: $F = 2,660$, $p = 0,047$; P10: $F = 9,655$, $p < 0,001$; P20: $F = 5,193$, $p = 0,003$; P30: $F = 29,377$, $p < 0,001$). Cosinorová analýza pro všechny skupiny prokázala signifikantní rytmus v expresi genu *Bmal1* (P1: $p = 0,0118$, $R^2 = 0,2804$; P10: $p < 0,0001$, $R^2 = 0,599$; P20: $p < 0,0001$, $R^2 = 0,5338$; P30: $p < 0,0001$, $R^2 = 0,8186$). Amplituda genové exprese opět s věkem narůstala (P1: 0,01177, P10: 0,0213, P20: 0,02553, P30: 0,02953). Rozdíl mezi amplitudami exprese genu *Bmal1* se mezi všemi věkovými skupinami statisticky významně lišil ($p < 0,001$ pro všechna vzájemná srovnání) (obr. 19).

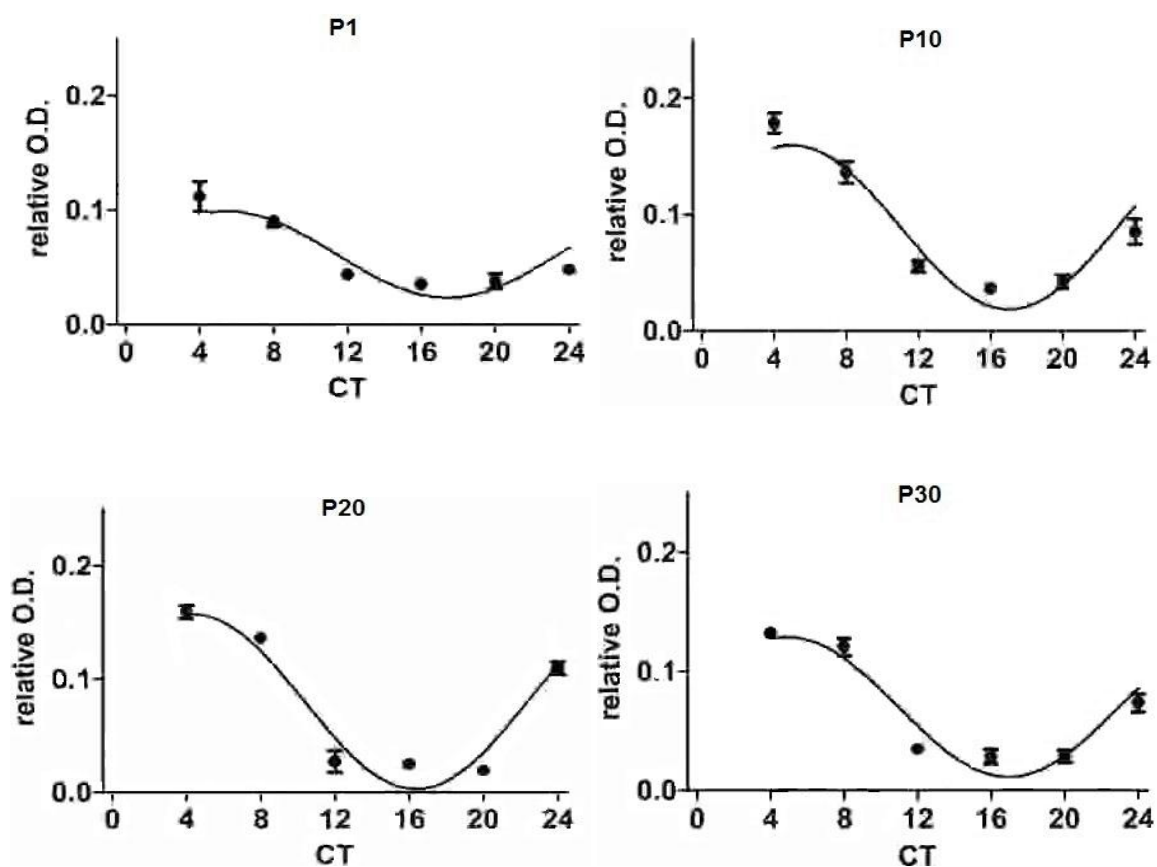
Porovnání profilů exprese genu *Bmal1* mezi jednotlivými věkovými skupinami mláďat pomocí dvojné analýzy variance prokázalo statisticky významný vliv času ($F = 28,297$, $p < 0,001$) i statisticky významný rozdíl mezi skupinami ($F = 93,240$, $p < 0,001$). Interakční efekt mezi časem a skupinami byl statisticky významný ($F = 1,780$, $p = 0,049$).

6.3.4 *Rev-erba* mRNA

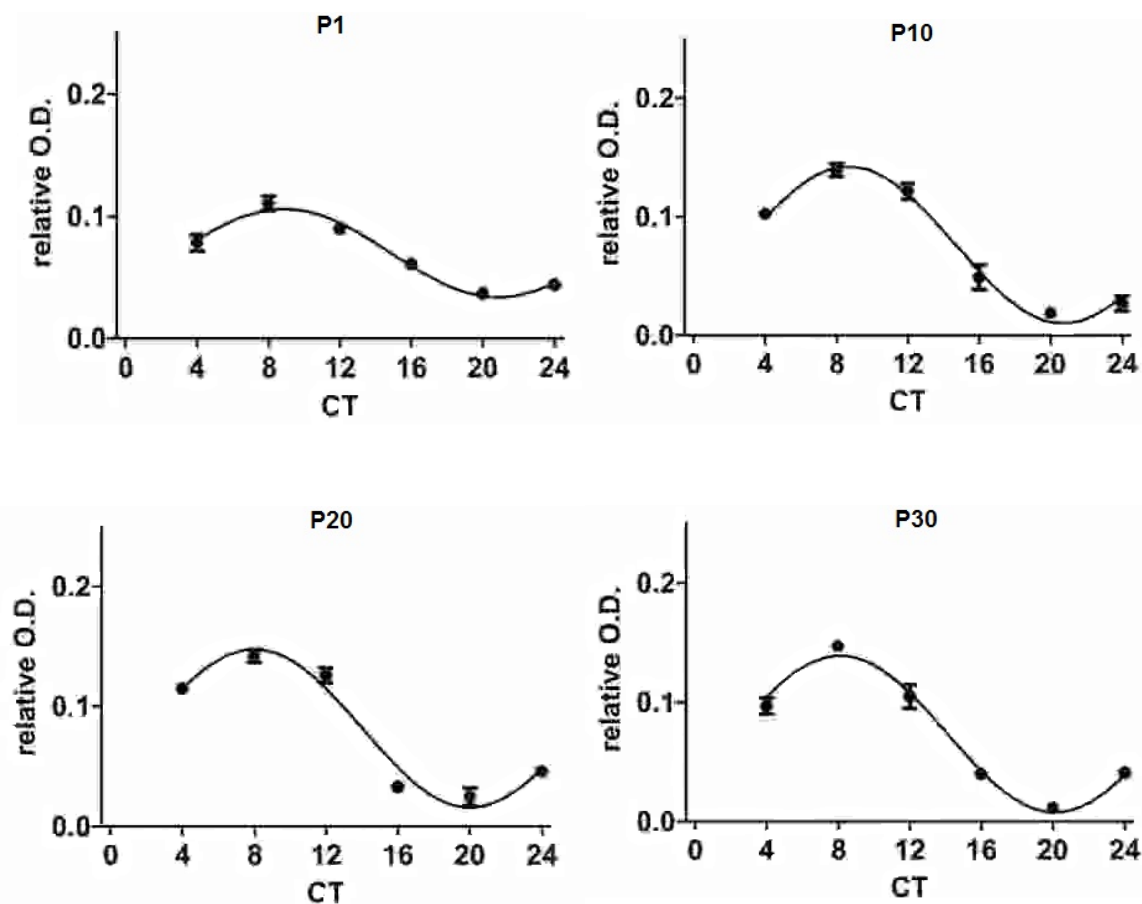
Jednoduchá analýza variance prokázala statisticky významný rozdíl v hladinách *Rev-erba* mRNA mezi jednotlivými časovými body u všech věkových skupin (P1: $F = 14,089$, $p < 0,001$; P10: $F = 99,759$, $p < 0,001$; P20: $F = 74,980$, $p < 0,001$; P30: $F = 68,797$, $p < 0,001$). Cosinorová analýza pro všechny skupiny prokázala signifikantní rytmus v expresi genu *Rev-erba* (P1: $p < 0,0001$, $R^2 = 0,7105$; P10: $p < 0,0001$, $R^2 = 0,9157$; P20: $p < 0,0001$, $R^2 = 0,9263$; P30: $p < 0,0001$, $R^2 = 0,8921$). Amplituda genové exprese s věkem mláďat vzrůstala a ve věku P10 dosáhla úrovně dospělého jedince (P1: 0,04695,

P10: 0,07309, P20: 0,06548, P30: 0,05838). Rozdíl mezi amplitudami exprese genu *Rev-erba* skupin P1 a P10 byl statisticky významný ($p < 0,001$) (obr. 20).

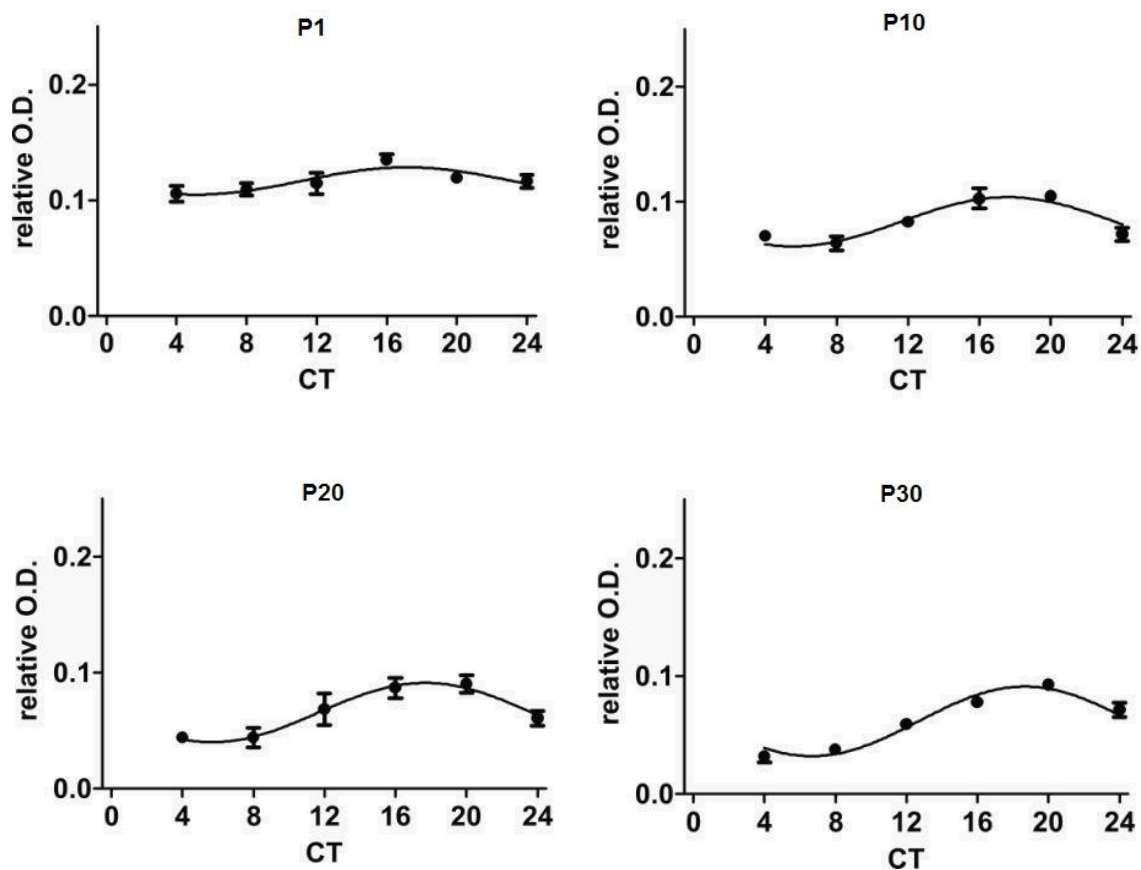
Porovnání profilů exprese genu *Rev-erba* mezi jednotlivými věkovými skupinami mláďat pomocí dvojné analýzy variance prokázalo statisticky významný vliv času ($F = 177,872$, $p < 0,001$) i statisticky významný rozdíl mezi skupinami ($F = 8,710$, $p < 0,001$). Interakční efekt mezi časem a skupinami byl statisticky významný ($F = 3,920$, $p < 0,001$).



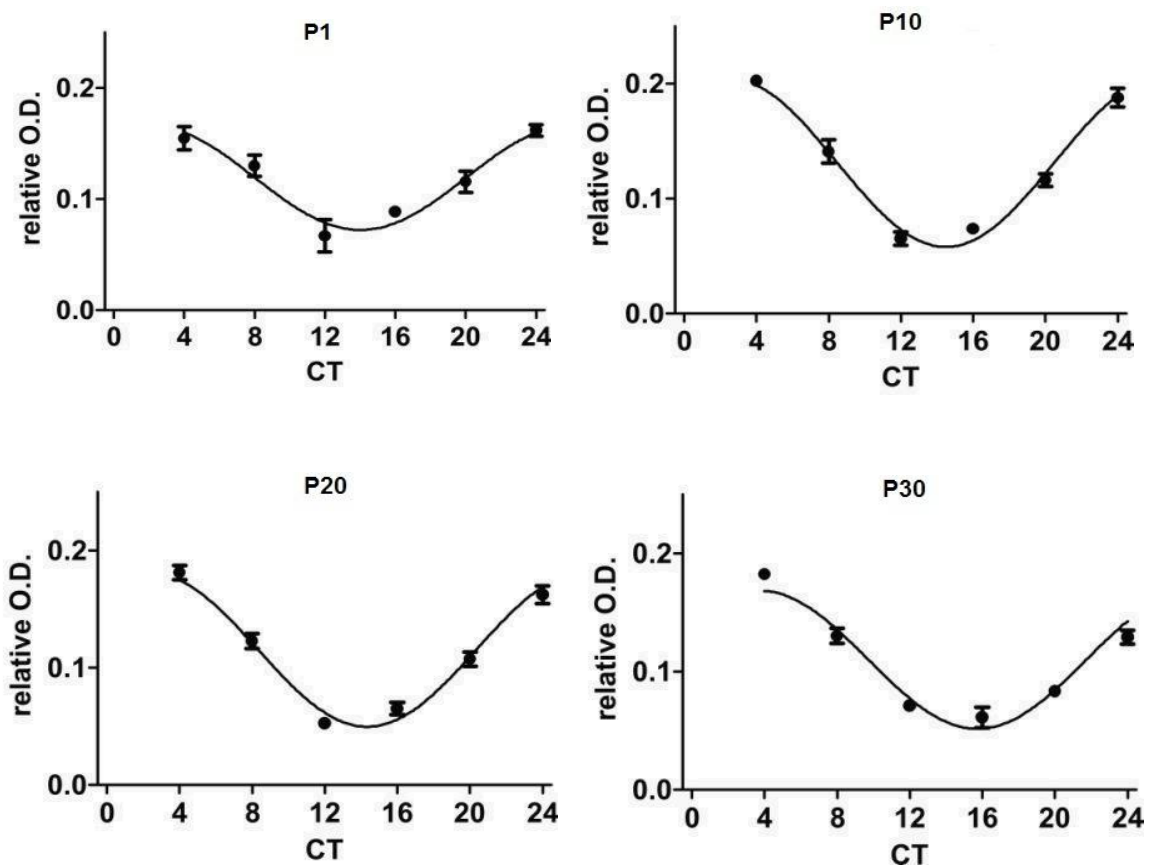
Obr. 17: Denní profily hladin *Per1* mRNA u mláďat potkana SHR. Data byla pro jednotlivé věky P1, P10, P20 a P30 proložena sinusoidní křivkou a vyhodnocena pomocí cosinorové analýzy. Na ose x je znázorněn čas v CT (cirkadiánní čas), na ose y relativní optická denzita. Data v každém časovém bodě představují průměr z 4-5 zvířat \pm S.E.M.



Obr. 18: Denní profily hladin *Per2* mRNA u mláďat potkana SHR. Data byla pro jednotlivé věky P1, P10, P20 a P30 proložena sinusoidní křivkou a vyhodnocena pomocí cosinorové analýzy. Na ose x je znázorněn čas v CT (cirkadiánní čas), na ose y relativní optická denzita. Data v každém časovém bodě představují průměr z 4-5 zvířat \pm S.E.M.



Obr. 19: Denní profily hladin *Bmal1* mRNA u mláďat potkana SHR. Data byla pro jednotlivé věky P1, P10, P20 a P30 proložena sinusoidní křivkou a vyhodnocena pomocí cosinorové analýzy. Na ose x je znázorněn čas v CT (cirkadiánní čas), na ose y relativní optická denzita. Data v každém časovém bodě představují průměr z 4-5 zvířat \pm S.E.M.



Obr. 20: Denní profily hladin *Rev-erba* mRNA u mláďat potkana SHR. Data byla pro jednotlivé věky P1, P10, P20 a P30 proložena sinusoidní křivkou a vyhodnocena pomocí cosinorové analýzy. Na ose *x* je znázorněn čas v CT (cirkadiánní čas), na ose *y* relativní optická denzita. Data v každém časovém bodě představují průměr z 4-5 zvířat \pm S.E.M.

Souhrn výsledků:

Z výsledků vyplývá, že exprese všech sledovaných hodinových genů v SCN u mláďat potkana SHR byla rytmická už ve věku P1, ale amplituda rytmické exprese byla u všech genů v tomto věku ještě nízká. Ve věku P10 dosáhla amplituda exprese genů *Per1*, *Per2* a *Rev-erba* úrovně dospělého jedince. Amplituda exprese genu *Bmal1* postupně vzrůstala až do věku P30.

6.4 SROVNÁNÍ VLIVU ZMĚNY REŽIMU V PŘÍJMU POTRAVY U MATKY NA VÝVOJ RYTMICKÉ EXPRESE VYBRANÝCH HODINOVÝCH GENŮ V SCN U MLÁĎAT POTKANŮ KMENE WISTAR A SHR

Denní profily exprese genů *Per2*, *Bmal1* a *Rev-erba* byly měřeny pomocí *in-situ* hybridizace u mláďat SHR v P1 a P10 a kmene Wistar v P10, jejichž matky byly chovány na LD a měly od zabřeznutí i) přístup k potravě *ad libitum* (skupina 1) nebo ii) omezený přístup k potravě (skupina 2) (postup viz 4.2.4).

6.4.1 VLIV VYSTAVENÍ MATEK ZMĚNĚ REŽIMU V PŘÍJMU POTRAVY NA VÝVOJ RYTMICKÉ EXPRESE VYBRANÝCH HODINOVÝCH GENŮ V SCN MLÁĎAT POTKANŮ KMENE SHR VE VĚKU P1

6.4.1.1 *Per2* mRNA

Porovnání profilů exprese genu *Per2* mezi jednotlivými skupinami mláďat pomocí dvojné analýzy variance prokázalo statisticky významný vliv času ($F = 19,588$, $p < 0,001$) a mezi skupinami byl statisticky významný rozdíl ($F = 121,256$, $p < 0,001$). Interakční efekt mezi časem a skupinami byl také statisticky významný ($F = 16,628$, $p < 0,001$). Cosinorová analýza prokázala rytmus v expresi genu *Per2* u obou skupin (skupina 1: $R^2 = 0,8756$, $p < 0,0001$; skupina 2: $R^2 = 0,6519$, $p < 0,0001$). Akrofáze rytmu v expresi *Per2* byla $8,866 \pm 0,2909$ u skupiny 1 a $4,039 \pm 0,5472$ u skupiny 2. Mezi oběma skupinami byl prokázán signifikantní rozdíl ve fázi rytmické exprese *Per2* ($t = 42,345$, $p < 0,001$) (obr. 21).

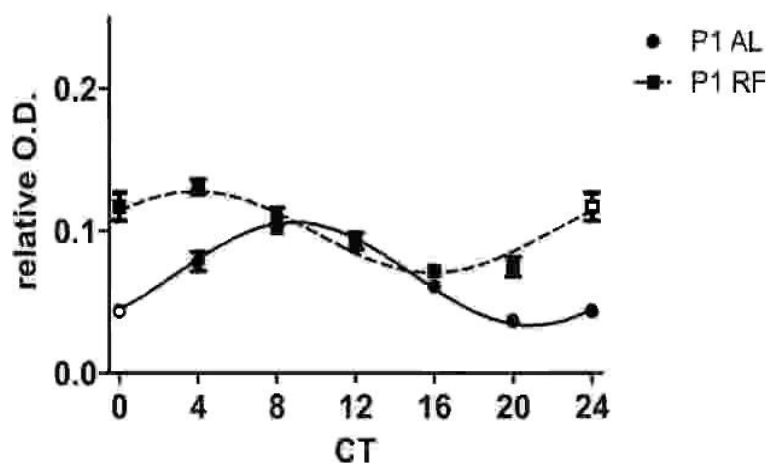
6.4.1.2 *Bmal1* mRNA

Porovnání profilů exprese genu *Bmal1* mezi jednotlivými skupinami mláďat pomocí dvojné analýzy variance prokázalo statisticky významný vliv času ($F = 6,106$, $p < 0,001$) i statisticky významný rozdíl mezi skupinami ($F = 5,732$, $p = 0,02$). Interakční efekt mezi časem a skupinami nebyl statisticky významný ($F = 0,830$, $p = 0,552$). Cosinorová analýza prokázala rytmickou expresi genu *Bmal1* u obou skupin (skupina 1: $R^2 = 0,2804$, $p = 0,0118$; skupina 2: $R^2 = 0,5454$, $p < 0,0001$). Akrofáze rytmu genové

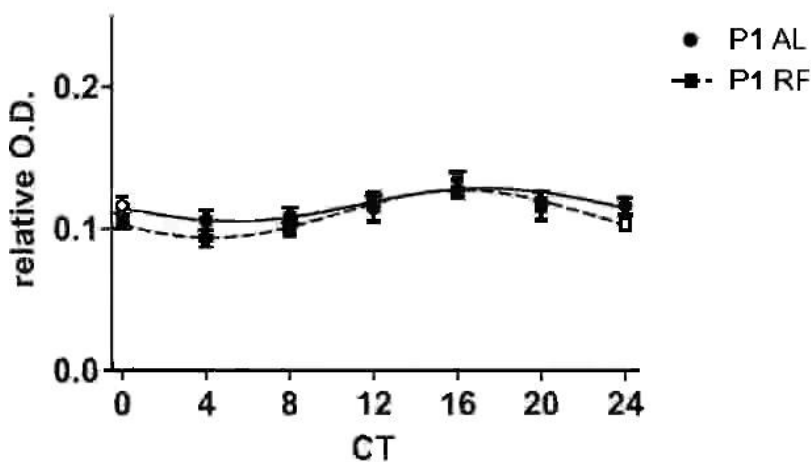
exprese pro skupinu 1 byla $17,142 \pm 1,178$ a pro skupinu 2 byla $16,081 \pm 0,6493$, rozdíl mezi akrofázemi byl statisticky významný ($t = 4,205$, $p < 0,001$) (obr. 22).

6.4.1.3 *Rev-erba mRNA*

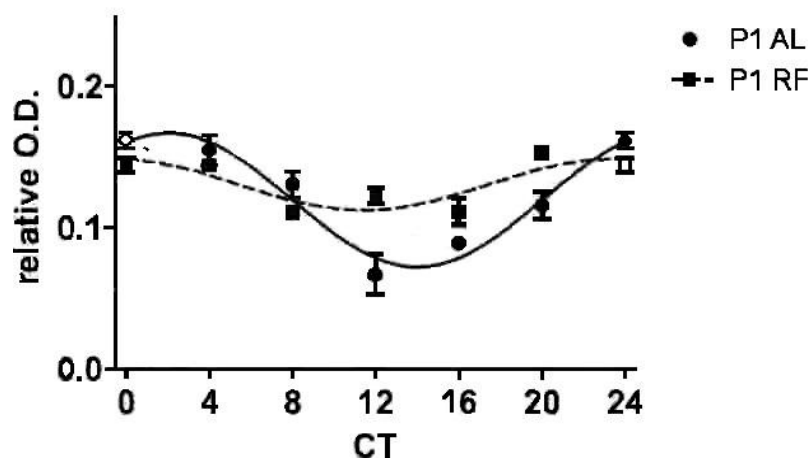
Porovnání profilů exprese genu *Rev-erba* mezi jednotlivými skupinami mláďat pomocí dvojné analýzy variance prokázalo statisticky významný vliv času ($F = 21,087$, $p < 0,001$), ale mezi skupinami statisticky významný rozdíl nebyl ($F = 3,158$, $p = 0,081$). Interakční efekt mezi časem a skupinami byl statisticky významný ($F = 8,272$, $p < 0,001$). Cosinorová analýza prokázala rytmickou expresi genu u obou skupin (skupina 1: $R^2 = 0,9338$, $p < 0,0001$; skupina 2: $R^2 = 0,5125$, $p < 0,0001$). Akrofáze rytmu genové exprese pro skupinu 1 byla $2,03 \pm 0,4697$, zatímco pro skupinu 2 byla $23,4557 \pm 0,7741$, rozdíl mezi akrofázemi u obou skupin byl statisticky významný ($t = 15,429$, $p < 0,001$) (obr. 23).



Obr. 21: Denní profily hladin *Per2* mRNA u mláďat potkana SHR. Profily u mláďat v P1, jejichž matky byly krmeny i) *ad libitum* (AL) – plná čára s kolečky ii) RF – přerušovaná čára se čtverečky, byly proloženy sinusoidní křivkou pomocí cosinorové analýzy. Na ose x je znázorněn čas v CT (cirkadiánní čas), na ose y relativní optická denzita. Data v každém časovém bodě představují průměr z 4-5 zvířat \pm S.E.M.



Obr. 22: Denní profily hladin *Bmal1* mRNA u mláďat potkana SHR. Profily u mláďat v P1, jejichž matky byly krmeny i) *ad libitum* (AL) – plná čára s kolečky ii) RF – přerušovaná čára se čtverečky, byly proloženy sinusoidní křivkou pomocí cosinorové analýzy. Na ose x je znázorněn čas v CT (cirkadiánní čas), na ose y relativní optická denzita. Data v každém časovém bodě představují průměr z 4-5 zvířat \pm S.E.M.



Obr. 23: Denní profily hladin *Rev-erbα* mRNA u mláďat potkana SHR. Profily u mláďat v P1, jejichž matky byly krmeny i) *ad libitum* (AL) – plná čára s kolečky ii) RF – přerušovaná čára se čtverečky, byly proloženy sinusoidní křivkou pomocí cosinorové analýzy. Na ose x je znázorněn čas v CT (cirkadiánní čas), na ose y relativní optická denzita. Data v každém časovém bodě představují průměr z 4-5 zvířat \pm S.E.M.

Souhrn výsledků:

Výsledky prokázaly rytmus v genové expresi v SCN u všech sledovaných hodinových genů u obou skupin mláďat kmene SHR ve věku P1. Vlivem vystavení matek RF (skupina 2) došlo k signifikantnímu fázovému posunu v cirkadiánním rytmu v genové expresi všech sledovaných genů ve srovnání s rytmy u mláďat, jejichž matky byly krmeny *ad libitum* (skupina 1).

6.4.2 VLIV VYSTAVENÍ MATEK ZMĚNĚ REŽIMU V PŘÍJMU POTRAVY NA VÝVOJ RYTMICKÉ EXPRESE VYBRANÝCH HODINOVÝCH GENŮ V SCN MLÁĎAT POTKANŮ KMENE SHR VE VĚKU P10

6.4.2.1 *Per2* mRNA

Porovnání profilů exprese genu *Per2* mezi oběma skupinami mláďat pomocí dvojné analýzy variance prokázalo statisticky významný vliv času ($F = 111,254$, $p < 0,001$) a mezi skupinami byl také statisticky významný rozdíl ($F = 77,899$, $p < 0,001$). Interakční efekt mezi časem a skupinami byl statisticky významný ($F = 2,828$, $p = 0,019$). Cosinorová analýza prokázala rytmickou genovou expresi u obou skupin (skupina 1: $R^2 = 0,9225$, $p < 0,0001$; skupina 2: $R^2 = 0,9309$, $p < 0,0001$). Došlo k mírnému fázovému posunu genové exprese. Akrofáze rytmu genové exprese pro skupinu 1 byla $8,691 \pm 0,2131$ a pro skupinu 2 byla $7,985 \pm 0,2097$. Rozdíl mezi akrofázemi byl statisticky významný ($t = 12,934$, $p < 0,001$) (obr. 24).

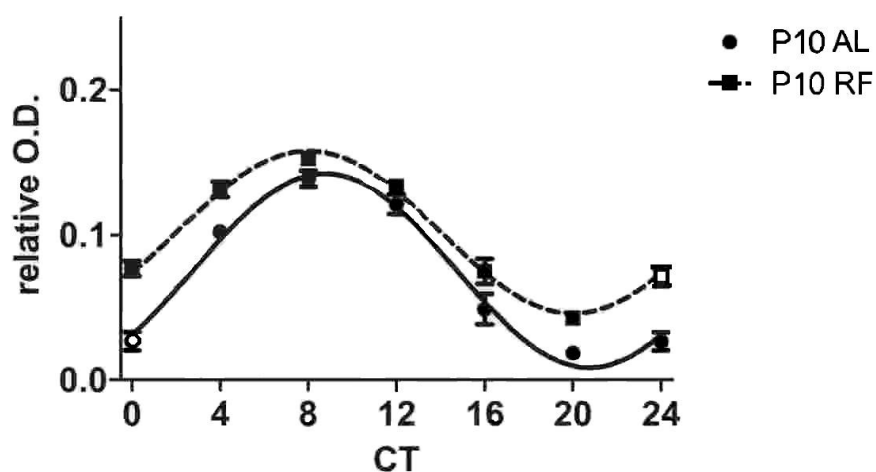
6.4.2.2 *Bmal1* mRNA

Porovnání profilů exprese genu *Bmal1* mezi oběma skupinami mláďat pomocí dvojné analýzy variance prokázalo statisticky významný vliv času ($F = 25,211$, $p < 0,001$) i mezi skupinami byl statisticky významný rozdíl ($F = 14,934$, $p < 0,001$). Interakční efekt mezi časem a skupinami nebyl statisticky významný ($F = 1,812$, $p = 0,115$). Cosinorová analýza prokázala rytmus v genové expresi u obou skupin (skupina 1: $R^2 = 0,599$, $p < 0,0001$; skupina 2: $R^2 = 0,8487$, $p < 0,0001$). Akrofáze rytmu genové exprese pro skupinu 1 byla $17,591 \pm 0,6014$ a pro skupinu 2 byla $17,49 \pm 0,2777$; rozdíl mezi akrofázemi nebyl statisticky významný ($t = 0,835$, $p = 0,407$) (obr. 25).

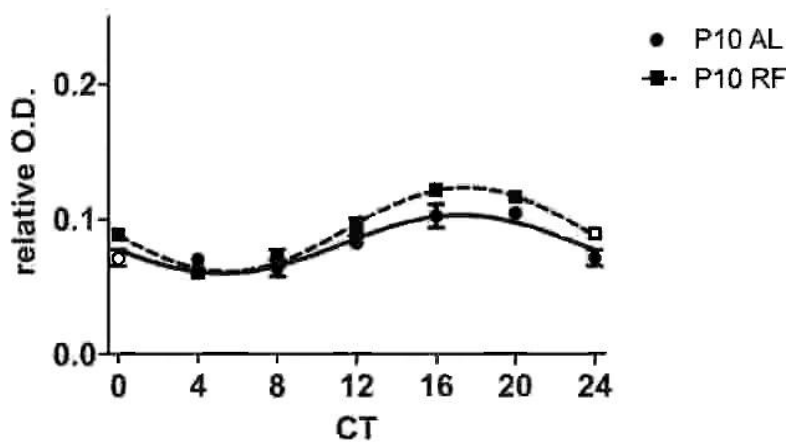
6.4.2.3 *Rev erba* mRNA

Porovnání profilů exprese genu *Rev-erba* mezi pokusnou a kontrolní skupinou mláďat pomocí dvojné analýzy variance prokázalo statisticky významný vliv času ($F = 139,239$, $p < 0,001$), také mezi skupinami byl statisticky významný rozdíl ($F = 62,732$, $p < 0,001$). Interakční efekt mezi časem a skupinami byl statisticky významný ($F = 3,657$,

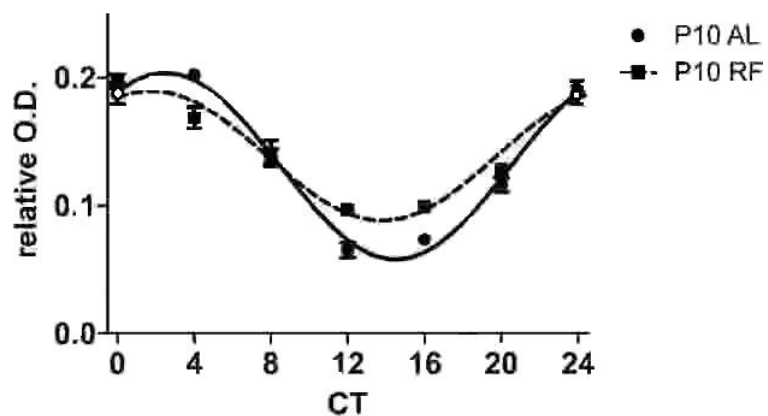
$p = 0,004$). Cosinorová analýza prokázala rytmickou expresi genu *Rev-erba* u obou skupin (skupina 1: $R^2 = 0,7105$, $p < 0,0001$; skupina 2: $R^2 = 0,9304$, $p < 0,0001$). Akrofáze rytmu genové exprese pro skupinu 1 byla $2,488 \pm 0,2125$ a pro skupinu 2 byla $2,424 \pm 0,2253$, rozdíl mezi akrofázemi nebyl statisticky významný ($t = 1,132$, $p = 0,262$) (obr. 26).



Obr. 24: Denní profily hladin *Per2* mRNA u mláďat potkana SHR. Profily u mláďat v P10, jejichž matky byly krmeny i) *ad libitum* – plná čára s kolečky ii) RF – přerušovaná čára se čtverečky, byly proloženy sinusoidní křivkou pomocí cosinorové analýzy. Na ose x je znázorněn čas v CT (cirkadiánní čas), na ose y relativní optická denzita. Data v každém časovém bodě představují průměr z 4-5 zvířat \pm S.E.M.



Obr. 25: Denní profily hladin *Bmal1* mRNA u mláďat potkana SHR. Profily u mláďat v P10, jejichž matky byly krmeny i) *ad libitum* – plná čára s kolečky ii) RF – přerušovaná čára se čtverečky, byly proloženy sinusoidní křivkou pomocí cosinorové analýzy. Na ose x je znázorněn čas v CT (cirkadiánní čas), na ose y relativní optická denzita. Data v každém časovém bodě představují průměr z 4-5 zvířat \pm S.E.M.



Obr.26: Denní profily hladin *Rev-erba* mRNA u mládřat potkana SHR. Profily u mládřat v P10, jejichž matky byly krmeny i) *ad libitum* – plná čára s kolečky ii) RF – přerušovaná čára se čtverečky, byly proloženy sinusoidní křivkou pomocí cosinorové analýzy. Na ose x je znázorněn čas v CT (cirkadiánní čas), na ose y relativní optická denzita. Data v každém časovém bodě představují průměr z 4-5 zvířat \pm S.E.M.

Souhrn výsledků:

U obou skupin mláďat kmene SHR ve věku P10 byl prokázán rytmus v genové expresi všech sledovaných hodinových genů. Signifikantní rozdíl mezi fázemi rytmických profilů u obou skupin byl prokázán pouze v případě genu *Per2*. Vystavení SHR matek RF tak mělo jen malý vliv na fázi rytmů v expresi většiny sledovaných genů v SCN mláďat v P10.

6.4.3 VLIV VYSTAVENÍ MATEK ZMĚNĚ REŽIMU V PŘÍJMU POTRAVY NA VÝVOJ RYTMICKÉ EXPRESE VYBRANÝCH HODINOVÝCH GENŮ V SCN MLÁĎAT POTKANŮ KMENE WISTAR VE VĚKU P10

6.4.3.1 *Per2* mRNA

Porovnání profilů exprese *Per2* mezi oběma skupinami mláďat pomocí dvojné analýzy variance prokázalo statisticky významný vliv času ($F = 137,479$, $p < 0,001$), ale mezi skupinami nebyl statisticky významný rozdíl ($F = 0,108$, $p = 0,744$). Interakční efekt mezi časem a skupinami byl statisticky významný ($F = 2,677$, $p = 0,024$). Cosinorová analýza prokázala rytmickou genovou expresi u obou skupin (skupina 1: $R^2 = 0,9341$, $p < 0,0001$; skupina 2: $R^2 = 0,9019$, $p < 0,0001$). Akrofáze rytmu genové exprese byla $9,314 \pm 0,2045$ pro skupinu 1 a $8,545 \pm$ pro skupinu 2; Rozdíl v akrofázích byl statisticky významný ($t = 14,810$, $p < 0,001$) (obr. 27).

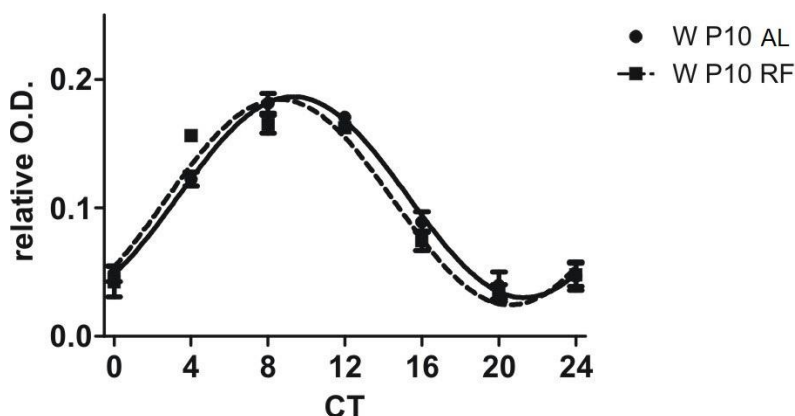
6.4.3.2 *Bmal1* mRNA

Porovnání profilů exprese *Bmal1* mezi oběma skupinami mláďat pomocí dvojné analýzy variance prokázalo statisticky významný vliv času ($F = 20,238$, $p < 0,001$), ale mezi skupinami nebyl statisticky významný rozdíl ($F = 2,920$, $p = 0,094$). Interakční efekt mezi časem a skupinami také nebyl statisticky významný ($F = 1,871$, $p = 0,104$). Cosinorová analýza prokázala rytmickou genovou expresi u obou skupin (skupina 1: $R^2 = 0,7674$, $p < 0,0001$; skupina 2: $R^2 = 0,5235$, $p < 0,0001$). Akrofáze rytmu genové exprese u skupiny 1 byla $18,27 \pm 0,3258$ a pro skupinu 2 byla $17,218 \pm 0,587$; Vzhledem k tomu, že ANOVA neprokázala statisticky významný rozdíl mezi skupinami, akrofáze obou profilů nebyly vzájemně porovnávány (obr. 28).

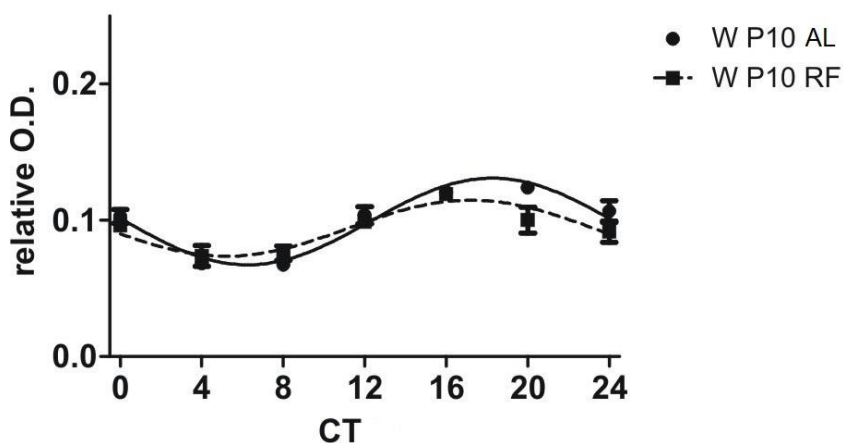
6.4.3.3 *Rev-erba* mRNA

Porovnání profilů exprese *Rev-erba* mezi oběma skupinami mláďat pomocí dvojné analýzy variance prokázalo statisticky významný vliv času ($F = 108,695$, $p < 0,001$), ale mezi skupinami nebyl statisticky významný rozdíl ($F = 1,390$, $p = 0,244$). Interakční efekt mezi časem a skupinami ale byl statisticky významný ($F = 6,879$, $p < 0,001$). Cosinorová analýza prokázala rytmickou genovou expresi u obou skupin (skupina 1: $R^2 = 0,8957$,

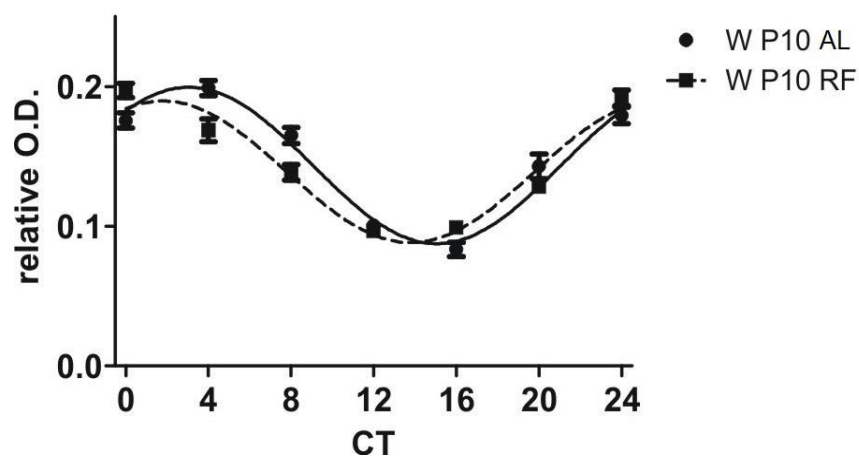
$p < 0,0001$; skupina 2: $R^2 = 0,8809$, $p < 0,0001$). Akrofáze u skupiny 1 byla $3,063 \pm 0,2363$, zatímco u skupiny 2 byla $1,792 \pm 0,284$; rozdíl mezi oběma akrofázemi byl statisticky významný ($t = 19,582$, $p < 0,001$) (obr. 29).



Obr. 27: Denní profily hladin *Per2* mRNA u mládřat potkana Wistar. Profily u mládřat v P10, jejichž matky byly krmeny i) *ad libitum* – plná čára s kolečky ii) RF – přerušovaná čára se čtverečky, byly proloženy sinusoidní křivkou pomocí cosinorové analýzy. Na ose x je znázorněn čas v CT (cirkadiánní čas), na ose y relativní optická denzita. Data v každém časovém bodě představují průměr z 4-5 zvířat \pm S.E.M.



Obr. 28: Denní profily hladin *Bmal1* mRNA u mládřat potkana Wistar. Profily u mládřat v P10, jejichž matky byly krmeny i) *ad libitum* – plná čára s kolečky ii) RF – přerušovaná čára se čtverečky, byly proloženy sinusoidní křivkou pomocí cosinorové analýzy. Na ose x je znázorněn čas v CT (cirkadiánní čas), na ose y relativní optická denzita. Data v každém časovém bodě představují průměr z 4-5 zvířat \pm S.E.M.



Obr. 29: Denní profily hladin *Rev-erba* mRNA u mláďat potkana Wistar. Profily u mláďat v P10, jejichž matky byly krmeny i) *ad libitum* – plná čára s kolečky ii) RF – přerušovaná čára se čtverečky, byly proloženy sinusoidní křivkou pomocí cosinorové analýzy. Na ose x je znázorněn čas v CT (cirkadiánní čas), na ose y relativní optická denzita. Data v každém časovém bodě představují průměr z 4-5 zvířat \pm S.E.M.

Souhrn výsledků:

U obou skupin mláďat kmene Wistar se prokázal rytmus v genové expresi v SCN u všech sledovaných hodinových genů. Rozdíl ve fázi rytmů mezi skupinami byl prokázán pro expresi *Per2* a *Rev-erba*, avšak ne pro *Bmal1*, pro který byl rozdíl pouze naznačen. Vystavení matek kmene Wistar podmínkám RF tak mělo vliv na fázi rytmické exprese *Per2* a *Rev-erba* v SCN mláďat v P10.

6.4.4 SROVNÁNÍ VLIVU VYSTAVENÍ MATEK ZMĚNĚ REŽIMU V PŘÍJMU POTRAVY NA VÝVOJ RYTMICKÉ EXPRESE VYBRANÝCH HODINOVÝCH GENŮ V SCN MLÁĎAT POTKANŮ VE VĚKU P10 MEZI KMENY WISTAR A SHR

6.4.4.1 *Per2* mRNA

Porovnání profilů exprese genu *Per2* mez skupinou SHR a Wistar mláďat pomocí dvojné analýzy variance prokázalo statisticky významný vliv času ($F = 128,095$, $p < 0,001$), mezi skupinami nebyl statisticky významný rozdíl ($F = 0,0871$, $p = 0,769$). Interakční efekt mezi časem a skupinami byl statisticky významný ($F = 6,414$, $p < 0,001$). Cosinorová analýza prokázala rytmus v genové expresi u obou skupin (SHR: $R^2 = 0,9309$, $p < 0,0001$; Wistar: $R^2 = 0,9019$, $p < 0,0001$). Akrofáze rytmu u skupiny Wistar byla $8,545 \pm 0,2166$ a pro skupinu 2 byla $7,985 \pm 0,2097$; rozdíl mezi oběma akrofázemi byl statisticky významný ($t = 10,476$, $P < 0,001$) (obr. 30).

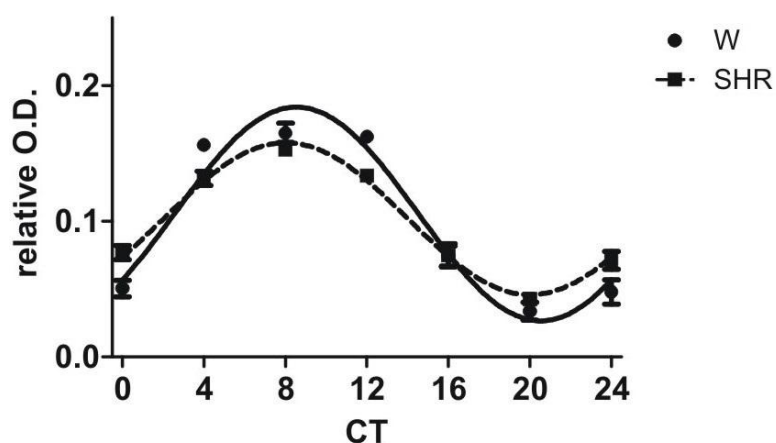
6.4.4.2 *Bmal1* mRNA

Porovnání profilů exprese genu *Bmal1* mezi skupinou SHR a Wistar mláďat pomocí dvojné analýzy variance prokázalo statisticky významný vliv času ($F = 22,038$, $p < 0,001$), mezi skupinami však statisticky významný rozdíl nebyl ($F = 0,391$, $p = 0,534$). Interakční efekt mezi časem a skupinami nebyl také statisticky významný ($F = 1,450$, $p = 0,215$). Cosinorová analýza prokázala rytmus v genové expresi u obou skupin (SHR – $R^2 = 0,8487$, $p < 0,0001$; Wistar – $R^2 = 0,5235$, $p < 0,0001$). Vzhledem k nevýznamným rozdílům mezi profily u kmenů SHR a Wistar nebyly akrofáze vzájemně porovnávány (obr. 31).

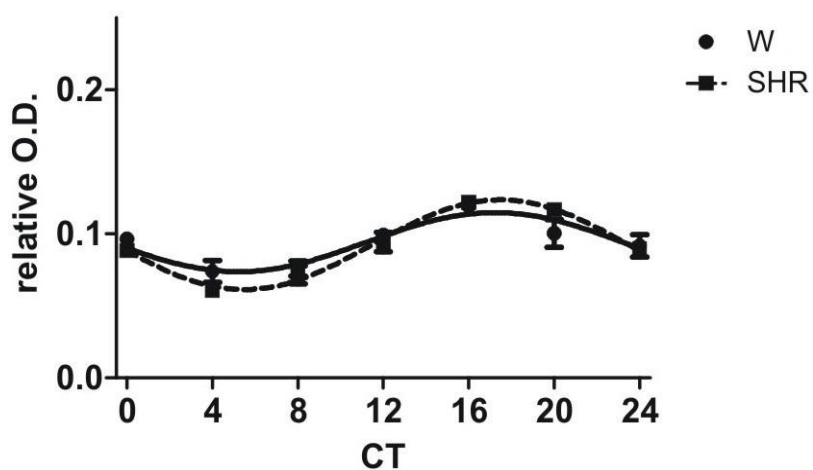
6.4.4.3 *Rev-erba* mRNA

Porovnání profilů exprese genu *Rev-erba* mezi skupinou SHR a Wistar mláďat pomocí dvojné analýzy variance prokázalo statisticky významný vliv času ($F = 117,822$, $p < 0,001$), rozdíl mezi skupinami byl také statisticky významný ($F = 34,418$, $p < 0,001$), stejně jako interakční efekt mezi časem a skupinami ($F = 2,946$, $p = 0,016$). Cosinorová analýza prokázala rytmus v genové expresi u obou skupin (SHR: $R^2 = 0,9304$, $p < 0,0001$; Wistar: $R^2 = 0,8809$, $p < 0,0001$). Akrofáze rytmu u skupiny Wistar byla $1,792 \pm 0,284$ a pro

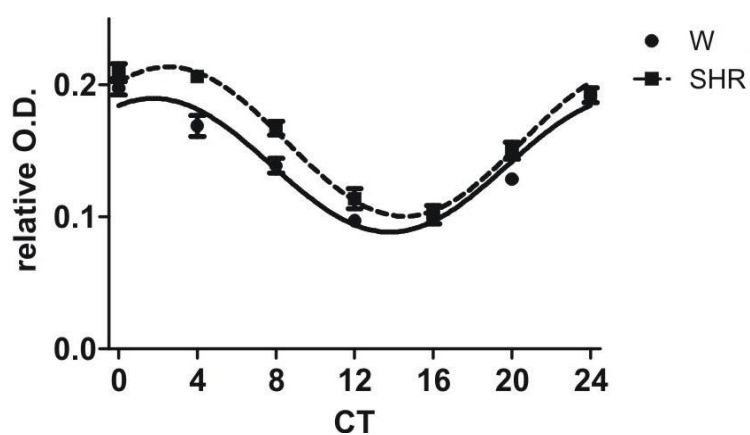
skupinu SHR byla $2,424 \pm 0,2253$; rozdíl mezi oběma akrofázemi byl statisticky významný ($t = 9,719$, $P < 0,001$) (obr. 32).



Obr. 30: Denní profily hladin *Per2* mRNA u mláďat potkana Wistar a SHR. Profily u mláďat v P10, jejichž matky byly krmeny RF i) mláďata Wistar – plná čára s kolečky ii) mláďata SHR – přerušovaná čára se čtverečky, byly proloženy sinusoidní křivkou pomocí cosinorové analýzy. Na ose x je znázorněn čas v CT (cirkadiánní čas), na ose y relativní optická denzita. Data v každém časovém bodě představují průměr z 4-5 zvířat \pm S.E.M.



Obr. 31: Denní profily hladin *Bmal1* mRNA u mláďat potkana Wistar a SHR. Profily u mláďat v P10, jejichž matky byly krmeny RF i) mláďata Wistar – plná čára s kolečky ii) mláďata SHR – přerušovaná čára se čtverečky, byly proloženy sinusoidní křivkou pomocí cosinorové analýzy. Na ose x je znázorněn čas v CT (cirkadiánní čas), na ose y relativní optická denzita. Data v každém časovém bodě představují průměr z 4-5 zvířat \pm S.E.M.



Obr. 32: Denní profily hladin *Rev-erbα* mRNA u mláďat potkana Wistar a SHR. Profily u mláďat v P10, jejichž matky byly krmeny RF i) mláďata Wistar – plná čára s kolečky ii) mláďata SHR – přerušovaná čára se čtverečky, byly proloženy sinusoidní křivkou pomocí cosinorové analýzy. Na ose x je znázorněn čas v CT (cirkadiánní čas), na ose y relativní optická denzita. Data v každém časovém bodě představují průměr z 4-5 zvířat \pm S.E.M.

Souhrn výsledků:

U obou skupin mláďat, jak kmene Wistar, tak SHR, byl prokázán signifikantní rytmus v genové expresi u všech sledovaných hodinových genů. Byl prokázán malý, ale signifikantní rozdíl ve fázi exprese genů *Per2* a *Rev-erba* mezi skupinami mláďat Wistar a SHR.

7. DISKUZE

7.1 VLIV PRENATÁLNÍHO NASTAVENÍ HODIN V SCN NA JEJICH VÝVOJ BĚHEM ČASNÉHO POSTNATÁLNÍHO OBDOBÍ

Výsledky tohoto experimentu prokázaly, že pokud jsou mláďata od narození po dobu deseti dnů vychovávána náhradní matkou na opačném světelném režimu, než byly chovány jejich původní matky, je fáze rytmu v genové expresi sledovaných genů *Per1*, *Per2*, *Bmal1* a *Rev-erba* v SCN plně přizpůsobena světelným podmínkám náhradní matky.

Z dostupné literatury je známo, že matka pomocí rytmických signálů ve svém těle nastavuje fázi vyvíjejících se cirkadiánních hodin plodů během prenatálního období tak, že cirkadiánní hodiny v SCN novorozených mláďat jsou plně synchronizovány s matkou (Sládek a kol., 2004). Po narození jsou hodiny v SCN slepých mláďat nejprve synchronizovány mateřským chováním a teprve postupně světlem (shrnutí v Sumová a kol., 2012). Předpokládali jsme, že po deseti dnech po narození strávených u náhradní matky na opačném světelném režimu, by mělo dojít k tomu, že se fáze exprese sledovaných hodinových genů v SCN přizpůsobí novým světelným podmínkám. Věk P10 byl vybrán proto, že z dostupné literatury vyplývá, že v tomto věku je mládě plně závislé na mateřské péči a současně jsou již jeho SCN synchronizována světlem (Matějů a kol., 2009). Vzhledem k náročnosti provedení nebylo podobných experimentů s výměnou mláďat provedeno mnoho, nicméně předchozí práce, které tento přístup využívaly (Duncan a kol., 1986; Honma a kol., 1987; Ohta a kol., 2002), ukázaly, že mateřské chování sice ovlivňuje vyvíjející se hodiny novorozených mláďat, nicméně již krátce po narození začíná být pro synchronizaci cirkadiánních hodin mláďat důležitějším signálem světlo. Jako věk, který je kritický pro schopnost SCN být plně synchronizován světlem, byl v pracích publikovaných v 80. letech považován věk P5 (Duncan a kol., 1986; Reppert a kol., 1984; Sasaki a kol., 1984). Tyto práce pro určení fáze cirkadiánních hodin v SCN mláďat používaly měření různých výstupních rytmů. Do věku P5 nebyl ještě cirkadiánní systém schopen se sám plně synchronizovat s okolními světelnými podmínkami (Duncan a kol., 1986) a proto se předpokládalo, že pro synchronizaci centrálních hodin jsou v tomto období důležité výhradně mateřské signály. Například pokusy, ve kterých mláďata byla

synchronizována předpokládanými mediátory mateřské synchronizace, jako např. aplikací agonisty D1-dopaminergních receptorů (Weaver & Reppert, 1995) nebo melatoninu (Grosse a kol., 1996), ukázaly, že aplikace těchto látek synchronizuje cirkadiánní hodiny novorozených potkanů resp. křečků pouze do zmiňovaného věku P5, přičemž jejich synchronizační účinek se ve věku P6-P10 vytrácí. Ve věku P6 byla mláďata schopna se plně synchronizovat s novým světelným režimem (Ohta a kol., 2002). Z práce, která se zabývala detailně vývojem světelné synchronizace SCN mláďat během časné ontogeneze, bylo zjištěno, že tyto hodiny jsou sice fotosenzitivní již ve věku P1, ale v tuto dobu světlo vyvolá odpověď v genové expresi v buňkách SCN během denní i noční doby a proto je není schopno synchronizovat. Tento mechanismus, kterým cirkadiánní hodiny řídí svou citlivost ke světlu ("gating mechanism"), a který představuje základní mechanismus umožňující synchronizaci cirkadiánního systému prostřednictvím světla, se vyvíjí postupně během prvního týdne po narození a jeho vývoj je plně ukončen až ve věku P10 (Matějů a kol., 2009). Z dostupné literatury tedy vyplývá, že do věku P5 jako synchronizační signály převládají signály od matky a s přibývajícím věkem vliv mateřského chování rychle slábne a světelná synchronizace nabývá na důležitosti.

Získané výsledky se tedy shodují s našimi předpoklady i dříve publikovanými daty, jelikož profily exprese všech sledovaných hodinových genů v SCN se ve věku P10 plně přizpůsobily světelnému režimu nových matek. Tento výsledek bude dále využit pro následující studie vývoje mateřské synchronizace periferních hodin v játrech a ve střevě mláďat po narození, jelikož tyto periferní hodiny se vyvíjí později než centrální hodiny v SCN a jsou více citlivé na režim v příjmu potravy, tedy režim kojení náhradní matkou.

7.2 VLIV LL a OMEZENÍ DOBY PŘÍJMU POTRAVY MATEK NA CIRKADIÁNNÍ PROFIL VYBRANÝCH HODINOVÝCH GENŮ V SCN U MLÁĐAT VE VĚKU P10 A P20

Výsledky našich experimentů prokázaly, že ve věku P10 byl u mláďat vychovávaných matkami na LL, které byly krmeny *ad libitum*, v SCN slabě signifikantní pouze rytmus v expresi genu *Rev-erba*, zatímco rytmy v expresi ostatních hodinových genů byly vyrušeny. U mláďat vychovávaných na LL matkami, které byly vystaveny RF, vykazovaly signifikantní cirkadiánní rytmy profily exprese hodinových genů *Per2* a *Rev-erba*, přičemž rytmus v expresi *Rev-erba* byl více signifikantní než u prvně zmiňované skupiny. Exprese genu *Bmal1* nebyla v P10 za těchto podmínek rytmická ani u jedné skupiny mláďat. Ve věku P20 u mláďat vychovávaných matkami na LL, které byly krmeny *ad libitum*, nebyly v SCN rytmické profily exprese žádného ze sledovaných hodinových genů, tj. *Per2*, *Bmal1* a *Rev-erba*. V případě mláďat vychovávaných matkami na LL a vystavených RF byl signifikantní pouze rytmus v expresi genu *Bmal1*, avšak amplituda tohoto rytmu byla jen velmi nízká. Exprese ostatních sledovaných genů cirkadiánní rytmus v tomto věku nevykazovaly.

Sledování vývoje rytmu v pohybové aktivitě mláďat po odstavu ukázalo na rozdíly mezi oběma skupinami mláďat. Rytmus v pohybové aktivitě mláďat, jejichž matky byly na LL vystaveny pravidelnému režimu v příjmu potravy, byl přítomen dříve, byl u jednotlivých mláďat navzájem synchronizován do stejné fáze a délka jejich vnitřní periody τ byla méně variabilní než v případě mláďat, jejichž matky byly chovány na LL a krmeny *ad libitum*.

Vystavení matek podmínkám LL od zabřeznutí dochází k postupné ztrátě rytmu v jejich pohybové aktivitě a během poslední třetiny březosti jsou zcela arytmičné (Nováková a kol., 2011). Předpokládali jsme proto, že vystavení březích samic podmínkám LL ovlivní jejich cirkadiánní hodiny v SCN tak, že nebudou schopny vysílat rytmický signál k hodinám v SCN jejich plodů. Následně po porodu vystavení matek a jejich mláďat podmínkám LL zabrání působení rytmických vlivů z vnějšího prostředí na vyvíjející se hodiny. V naší práci jsme testovali hypotézu, že díky těmto experimentálním podmínkám dojde k narušení vývoje cirkadiánních rytmů samotných mláďat. Z předchozích studií vyplývá, že dlouhodobé vystavení dospělých zvířat LL desynchronizuje jednotlivé neurony SCN (Ohta a kol., 2005a), cirkadiánní rytmy jsou narušeny a zřejmě díky tomu dochází ke

ztrátě rytmu v pohybové aktivitě (Ohta a kol., 2005a; Pittendrigh a Daan, 1976). Tento vliv LL na pohybovou aktivitu byl prokázán nejen u samců, ale také u březích samic, chovaných na LL od zabřeznutí (Nováková a kol., 2011), tedy ve stejných experimentálních podmínkách, jako byly chovány samice v našem experimentu. Vyrušení rytmických signálů vlivem LL mělo významný vliv na vývoj cirkadiánních hodin v SCN. Zatímco v předchozím pokuse byly cirkadiánní rytmy v expresi hodinových genů v SCN mláďat v P10 chovaných na LD12:12 plně vyvinuty, vlivem LL došlo k výraznému potlačení těchto rytmů. Tento efekt byl ještě výraznější v pozdějším věku, tj. v P20. Sledování lokomoční aktivity mláďat vystavených těmto podmínkám následně po odstavu ukázalo, že LL mělo dvojí vliv na hodiny v SCN mláďat. Za prvé narušilo samotnou funkci vlastních hodin v SCN, jelikož rytmus v lokomoční aktivitě byl po vypuštění na DD nejprve potlačen, a byl prokazatelný postupně až za několik dní strávených v DD. Navíc byla prokázána poměrně velká variabilita v hodnotách vnitřní periody τ . Za druhé byly v důsledku absence synchronizačního signálu od matky hodiny v SCN jednotlivých mláďat vzájemně desynchronizovány, jelikož počátek subjektivního dne, definovaný jako konec pohybové aktivity mláďat ve skupině byl značně variabilní. Všechny tyto následky vývoje hodin v arytmičtém prostředí zcela vymizely během dalšího vývoje v rytmických podmínkách, kdy byla mláďata chována na standardním světelném režimu LD12:12. Výsledky ukazují na skutečnost, že podmínky, za jakých se cirkadiánní hodiny vyvíjí během časně ontogeneze, mohou do značné míry ovlivnit jejich funkci. Toto poškození vývoje hodin však může být kompenzováno během následujícího vývojového stádia.

V další části práce jsme testovali hypotézu, že rytmické chování matky může zmírnit výše popsany dopad vlivu LL na vývoj cirkadiánních hodin v SCN mláďat. Rytmické chování matek jsme navodili pomocí pravidelného režimu v příjmu potravy. V podmínkách LL zvířata přijímají potravu nepravidelně během dne a noci (Polidarová a kol., 2011). Omezení přístupu k potravě po dobu 6 hodin navodilo u samic denní rytmus v pohybové aktivitě, jelikož zvířata byla aktivní převážně v době, kdy jim byla poskytnuta potrava.

Z našich výsledků vyplývá, že pokud jsou mláďata vychovávána na LL a jejich matky mají navozený rytmus v pohybové aktivitě v důsledku omezení doby přístupu k potravě, dochází k částečné synchronizaci rytmů v expresi u některých sledovaných hodinových genů v SCN jejich mláďat, přičemž efekt je větší u mláďat ve věku P10 než P20. Rozdíl mezi desetidenními a dvacetidenními mláďaty byl zřejmě způsoben tím, že pro mláďata ve

věku P20 je synchronizace prostřednictvím mateřského chování již zanedbatelná a proto nemůže u mláďat v P20 ovlivnit profily exprese hodinových genů v SCN, které jsou tak již více citlivé na vliv LL. Naše výsledky jsou v souladu se staršími pracemi a potvrzují, že za podmínek stálého světla se může RF uplatnit jako synchronizační mechanismus ve vývoji rytmické exprese hodinových genů v SCN.

Následné sledování pohybové aktivity u mláďat po odstavu ukázalo, že rytmické chování matky zabránilo nebo zmírnilo vliv vystavení LL, pozorovaný u skupiny mláďat, jejichž matky byly krmeny *ad libitum*. Po vypuštění do stálé tmy byly rytmy v pohybové aktivitě mláďat odstavených od matek s navozeným rytmickým chováním významně dříve signifikantní, vnitřní perioda těchto rytmů byla méně variabilní a hodiny jednotlivých mláďat byly vzájemně synchronizovány. Výsledky také naznačují, že absence cirkadiálních rytmů u této skupiny mláďat zjištěná v P20 byla zřejmě spíše důsledkem maskujícího vlivu LL na hodiny v SCN, než důsledkem vzájemné desynchronizace mezi jedinci.

Z výsledků studie vyplývá, že rytmické chování matky během postnatálního vývoje má významně pozitivní vliv na vývoj cirkadiálních hodin v SCN mláďat během ontogeneze.

7.3 VÝVOJ DENNÍCH PROFILŮ EXPRESE VYBRANÝCH HODINOVÝCH GENŮ V SCN U MLÁĎAT POTKANA KMENE SHR

V tomto experimentu jsme zjistili, že exprese všech sledovaných hodinových genů (*Per1*, *Per2*, *Bmal1* a *Rev-erba*) byla u mláďat potkana kmene SHR rytmická už ve věku P1, ale amplituda dosahovala pouze nízké úrovně. Ve věku P10 již amplituda exprese hodinových genů *Per1*, *Per2* a *Rev-erba* dosahuje stejné úrovně jako ve věku P20 a P30 – je tedy na úrovni dospělého jedince. Amplituda exprese genu *Bmal1* vzrůstá postupně až do posledního sledovaného věku, tj. P30.

Kmen potkana SHR byl vybrán proto, že se jedná o vzácný animální model s komplexními patofyziologickými projevy, o jehož chodu a vývoji cirkadiánních hodin toho není příliš známo. V předchozích studiích bylo prokázáno, že vnitřní perioda τ je za konstantních podmínek u dospělých zvířat kratší než u potkanů kmene Wistar (Sládek a kol., 2012). Předpokládali jsme, že by se tak mohl lišit i vývoj rytmické exprese hodinových genů v SCN mláďat SHR. Z předchozích ontogenetických experimentů provedených na mláďatech potkana kmene Wistar vyplývá, že exprese *Per1* a *Per2* je rytmická už ve věku E20 (Kováčiková a kol., 2006; Ohta a kol., 2002, 2003) a genu *Bmal1* ve věku P3 (Sládek a kol., 2004), ale amplituda těchto rytmů byla nižší než ve věku P10, kdy byl rytmus v expresi těchto hodinových genů na úrovni dospělého zvířete (Sládek a kol., 2004). Z těchto dat je zřejmé, že rytmy v expresi hodinových genů se v SCN u potkana kmene Wistar vyvíjí postupně až do desátého dne po narození.

Z našich výsledků vyplývá, že exprese všech sledovaných hodinových genů byla u mláďat potkana kmene SHR rytmická už ve věku P1, ale stejně jako u potkanů kmene Wistar amplituda dosahovala pouze nízké úrovně. Ve věku P10 již amplituda exprese hodinových genů *Per1*, *Per2* a *Rev-erba* dosahuje stejné úrovně jako ve věku P20 a P30 – je tedy na úrovni dospělého jedince. Na rozdíl od potkana kmene Wistar však amplituda rytmu v expresi genu *Bmal1* vzrůstala až do posledního sledovaného věku P30. Vývoj exprese zbývajících sledovaných hodinových genů *Per1*, *Per2* a *Rev-erba* se u potkanů kmene SHR neliší od výsledků předchozích experimentů prováděných na mláďatech kmene Wistar (Kováčiková a kol., 2006; Ohta a kol., 2002; 2003; Sládek a kol., 2004). Zjištění rozdílné dynamiky vývoje rytmické exprese genu *Bmal1* u mláďat SHR je zajímavý s ohledem na nález několika polymorfismů v promotoru genu *Bmal1* u dospělých potkanů

SHR, které souvisí s rozvojem některých patologických symptomů (Woon a kol., 2007). Zda opožděný vývoj rytmické exprese tohoto genu souvisí s těmito abnormalitami u SHR, však není známo.

7.4 VLIV VYSTAVENÍ MATEK ZMĚNĚ REŽIMU V PŘÍJMU POTRAVY NA VÝVOJ RYTMICKÉ EXPRESE VYBRANÝCH HODINOVÝCH GENŮ V SCN MLÁĎAT POTKANŮ KMENE WISTAR A SHR

Výsledky prokázaly přítomnost cirkadiánních rytmů v expresi všech sledovaných hodinových genů v SCN, a to ve věku P1 i P10, u mláďat obou sledovaných kmenů, jejichž matky byly chovány na LD a krmeny buď *ad libitum* nebo vystaveny RF od zabřeznutí. Vliv RF na fázi rytmů v expresi hodinových genů v SCN byl závislý na věku a kmeni zvířat.

V tomto experimentu jsme vycházeli z hypotézy, že nezralá SCN by mohla být citlivá na RF podobně jako periferní orgány u dospělých jedinců (Sumová a kol., 2006). Při synchronizaci periferních orgánů jsou signály z periferie, související s dobou příjmu a zpracováním potravy, silnějším synchronizátorem než signály z centrálních hodin. Za přirozených podmínek je doba příjmu potravy kontrolována centrálními hodinami, tudíž oba faktory působí v souladu. Pokud je u dospělých zvířat doba příjmu potravy omezena na dobu, kdy zvířata potravu přirozeně nepřijímají, signály tvořené při zpracování potravy se fázově posunou vůči signálům z SCN a při synchronizaci periferních hodin převládnou (Damiola a kol., 2000). Fáze hodin v SCN u dospělých jedinců zůstane neovlivněna (Hara a kol., 2001). V našich experimentech jsme chtěli zjistit, zda pro vyvíjející se fetální a neonatální SCN jsou důležitějším synchronizujícím faktorem signály z mateřského SCN, řízené denním světelným režimem, či změna doby příjmu potravy, která způsobí, že matky jsou nuceny být aktivní kromě noční doby také během světlé části dne. Dále jsme chtěli porovnat, zda se případný efekt bude projevovat v prenatalním či postnatalním období. Vliv RF na fetální a neonatální SCN nebyl dosud zkoumán.

Samice vystavené RF měly potravu dostupnou během světlé části cyklu LD12:12, aby bylo možno sledovat případný synchronizační vliv RF na fázi hodin během prenatalního (u mláďat v P1) a postnatalního (u mláďat v P10) období. Během prenatalního období byl zkoumán vliv RF pouze u SHR, jelikož obdobný experiment dříve neprokázal jeho významný efekt na hodiny v SCN mláďat potkana kmene Wistar v P1 (Nováková a kol., 2010). Naproti tomu, naše současné výsledky prokázaly, že vystavení březích SHR samic RF mělo významný vliv na fázi rytmů v expresi genů v SCN jejich mláďat. Výsledky tak naznačují, že březí samice SHR by mohly být více citlivé na vystavení podmínkám RF, než samice kmene Wistar. Tyto výsledky jsou v souladu s nedávným

zjištěním, že dospělí samci kmene SHR jsou více citliví k RF než samci kmene Wistar, jelikož se u nich vyvíjí dříve a silněji anticipační chování, které předchází RF. Kromě toho jsou u nich vlivem RF více fázově posunuty cirkadiánní hodiny v játrech (Polidarová a kol., odesláno do tisku). Bylo by tedy možné spekulovat, že pokud se cirkadiánní hodiny v SCN fétů chovají podobně jako periferní hodiny u dospělých (Sumová a kol., 2006) a jsou podobně seřizovány signály z mateřských SCN, mohl by být tento signál u SHR samic silnější než u samic kmene Wistar. Tato rozdílná citlivost na RF by pak mohla vysvětlit rozdíl mezi efektem RF u březích samic na synchronizaci hodin v SCN u obou kmenů potkana. Je však třeba zmínit, že v případě dřívějšího pokusu u samic kmene Wistar byla fáze cirkadiánních hodin v SCN mláďat v P1 stanovována pomocí jiných ukazatelů než v současné práci, a to pomocí rytmů v expresi hodinami kontrolovaného genu *Avp* a časného raného genu *c-fos* (Nováková a kol., 2010). Zjištěný rozdíl mezi oběma kmeny bude tedy třeba ještě ověřit v dalších experimentech.

Během postnatálního období vliv vystavení matky RF na fázi rytmické exprese hodinových genů v SCN mláďat potkanů obou kmenů klesá. Ve věku P10 byl již tento efekt téměř zanedbatelný. Přestože byly zaznamenány signifikantní rozdíly ve fázi některých hodinových genů v SCN (*Per2* a *Rev-erba* u kmene Wistar a *Per2* u kmene SHR), byly tyto posuny výrazně menší než ve věku P1. Porovnání fáze rytmické exprese hodinových genů v SCN v P10 u mláďat SHR a kmene Wistar ukázalo, že rozdíly v reakci obou kmenů jsou pouze nepatrné.

Naše výsledky tak naznačily větší citlivost cirkadiánních hodin v SCN fétů SHR na situaci, kdy jejich matky jsou vystaveny RF. Dále výsledky prokázaly, že vliv vystavení matky RF na fázi hodin v SCN jejich mláďat je v P10 již jen velmi malý a s věkem tak významně slábne.

8. ZÁVĚR

Z výsledků mé diplomové práce vyplývá, že cirkadiánní systém potkana prochází během časně ontogeneze velkými změnami a je během tohoto období citlivý k podmínkám, ve kterých jsou novorozená mláďata společně se svými matkami chována. Pro synchronizaci SCN mláďat během rané fáze vývoje jsou důležité mateřské signály společně se signály z okolního prostředí. Pokud jsou matky chovány za arytmičtých podmínek, jako je stálé světlo, nevyvíjí se rytmická exprese sledovaných hodinových genů ani rytmus v pohybové aktivitě u jejich mláďat správně. K jejich resynchronizaci může dojít postnatální expozicí rytmickým světelným podmínkám nebo rytmickým chováním matek, navozeným podáváním potravy jen v určité části dne. Rytmická exprese hodinových genů v SCN mláďat chovaných na stálém světle, jejichž matky jsou vystaveny RF, však nedosahuje takové amplitudy, jako při vývoji za normálních světelných podmínek. Z výsledků dále vyplývá, že i za standardních světelných podmínek je vývoj rytmické exprese sledovaných genů v SCN mláďat citlivý k nesvětelným signálům. Pokud je matkám podávána potrava jen ve světlé části dne, dojde k fázovému posunu rytmu genové exprese. Z výsledků je patrné, že senzitivita cirkadiánních hodin v SCN mláďat za situace, kdy jejich matky jsou vystaveny RF synchronizaci, je nejvyšší v prenatálním období a po narození klesá.

Při srovnání vývoje cirkadiánní exprese hodinových genů i vývoje synchronizace cirkadiánního systému u potkana Wistar a SHR jsme zjistili malé, ale signifikantní rozdíly mezi oběma sledovanými kmeny potkana. Tato skutečnost poukazuje na to, že vývoj centrálních hodin by mohl být pro jednotlivé kmeny potkana specifický, ale tento rozdíl bude třeba ještě potvrdit v dalších experimentech.

I přes zjištěnou plasticitu cirkadiánního systému a jeho schopnost navodit cirkadiánní oscilace i poté, kdy jeho vývoj neprobíhá správně, není dostatek dat, který by dokazoval, že nedojde k jeho poškození z dlouhodobého hlediska. Vzhledem k tomu, že je tento systém zapojen v řízení mnoha fyziologických funkcí a jeho poškození může způsobit širokou škálu zdravotních potíží, je důležité se snažit dále porozumět problematice jeho vývoje a pomoci tak v prevenci a léčbě mnoha onemocnění.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Abe, H., Honma, S., Namihira, M., Masubuchi, S., Ikeda, M., Ebihara, S. & Honma, K. Clock gene expressions in the suprachiasmatic nucleus and other areas of the brain during rhythm splitting in CS mice. *Molecular Brain Research* 87, 92-99 (2001).
- Abrahamson, E. E. & Moore, R. Y. Suprachiasmatic nucleus in the mouse: retinal innervation, intrinsic organization and efferent projections. *Brain Research* 916, 172-191 (2001).
- Akhtar, R. A., Reddy, A. B., Maywood, E. S., Clayton, J. D., King, V. M., Smith, A. G., Gant, T. W., Hastings, M. H. & Kyriacou, C. P. Circadian cycling of the mouse liver transcriptome, as revealed by cDNA microarray, is driven by the suprachiasmatic nucleus. *Current Biology* 12, 540-550 (2002).
- Albrecht, U. The mammalian circadian clock: A network of gene expression. *Frontiers in Bioscience* 9, 48-55 (2004).
- Albrecht, U., Zheng, B. H., Larkin, D., Sun, Z. S. & Lee, C. C. mPer1 and mPer2 are essential for normal resetting of the circadian clock. *Journal of Biological Rhythms* 16, 100-104 (2001).
- Albus, H., Vansteensel, M. J., Michel, S., Block, G. D. & Meijer, J. H. A GABAergic mechanism is necessary for coupling dissociable ventral and dorsal regional oscillators within the circadian clock. *Current Biology* 15, 886-893 (2005).
- Armstrong, S. M., Cassone, V. M., Chesworth, M. J., Redman, J. R. & Short, R. V. Synchronization of mammalian circadian rhythms by melatonin. *Journal of Neural Transmission*, 375-394 (1986).
- Aton, S. J., Colwell, C. S., Harmar, A. J., Waschek, J. & Herzog, E. D. Vasoactive intestinal polypeptide mediates circadian rhythmicity and synchrony in mammalian clock neurons. *Nature Neuroscience* 8 (2005).
- Aton, S. J. & Herzog, E. D. Come together, right...now: Synchronization of rhythms in a mammalian circadian clock. *Neuron* 48, 531-534 (2005).
- Balsalobre, A. Clock genes in mammalian peripheral tissues. *Cell and Tissue Research* 309, 193-199 (2002).
- Balsalobre, A., Brown, S. A., Marcacci, L., Tronche, F., Kellendonk, C., Reichardt, H. M., Schutz, G. & Schibler, U. Resetting of circadian time peripheral tissues by glucocorticoid signaling. *Science* 289, 2344-2347 (2000).
- Balsalobre, A., Damiola, F. & Schibler, U. A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. *Cell* 93, 929-937 (1998).
- Bartness, T. J., Song, C. K. & Demas, G. E. SCN efferents to peripheral tissues: Implications for biological rhythms. *Journal of Biological Rhythms* 16, 196-204 (2001).
- Bellavia, S. L., Carpentieri, A. R., Vaque, A. M., Macchione, A. F. & Vermouth, N. T. Pup circadian rhythm entrainment - effect of maternal ganglionectomy or pinealectomy. *Physiology & Behavior* 89, 342-349 (2006).
- Berson, D. M., Dunn, F. A. & Takao, M. Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science* 295, 1070-1073 (2002).

- Brown, S. A., Zumbrunn, G., Fleury-Olela, F., Preitner, N. & Schibler, U. Rhythms of mammalian body temperature can sustain peripheral circadian clocks. *Current Biology* 12, 1574-1583 (2002).
- Buhr, E. D., Yoo, S. H. & Takahashi, J. S. Temperature as a Universal Resetting Cue for Mammalian Circadian Oscillators. *Science* 330, 379-385 (2010).
- Card, J. P. & Moore, R. Y. Organization of lateral geniculate hypothalamic connections in the rat. *Journal of Comparative Neurology* 284, 135-147 (1989).
- Colwell, C. S. & Foster, R. G. Photoc regulation of fos-like immunoreactivity in the suprachiasmatic nucleus of the mouse. *Journal of Comparative Neurology* 324, 135-142 (1992).
- Conrad, C. H., Brooks, W. W., Hayes, J. A., Sen, S., Robinson, K. G. & Bing, O. H. L. Myocardial fibrosis and stiffness with hypertrophy and heart-failure in the spontaneously hypertensive rat. *Circulation* 91, 161-170 (1995).
- Cutler, D. J., Haraura, M., Reed, H. E., Shen, S., Sheward, W. J., Morrison, C. F., Marston, H. M., Harmar, A. J. & Piggins, H. D. The mouse VPAC(2) receptor confers suprachiasmatic nuclei cellular rhythmicity and responsiveness to vasoactive intestinal polypeptide in vitro. *European Journal of Neuroscience* 17, 197-204 (2003).
- Damiola, F., Le Minh, N., Preitner, N., Kornmann, B., Fleury-Olela, F. & Schibler, U. Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes & Development* 14, 2950-2961 (2000).
- Danilenko, K. V., Plisov, I. L., Cooper, H. M., Wirz-Justice, A. & Hebert, M. Human Cone Light Sensitivity and Melatonin Rhythms Following 24-hour Continuous Illumination. *Chronobiology International* 28, 407-414 (2011).
- Davis, F. C. & Mannion, J. Entrainment of hamster pup circadian rhythms by prenatal melatonin injections to the mother. *American Journal of Physiology* 255, 439-448 (1988).
- Dent, G. W., Okimoto, D. K., Smith, M. A. & Levine, S. Stress-induced alterations in corticotropin-releasing hormone and vasopressin gene expression in the paraventricular nucleus during ontogeny. *Neuroendocrinology* 71, 333-342 (2000).
- Duffield, G. E. & Ebling, F. J. P. Maternal entrainment of the developing circadian system in the Siberian hamster (*Phodopus sungorus*). *Journal of Biological Rhythms* 13, 315-329 (1998).
- Duncan, M. J., Banister, M. J. & Reppert, S. M. Developmental appearance of light-dark entrainment in the rat. *Brain Research* 369, 326-330 (1986).
- Dunlap, J. C. Molecular bases for circadian clocks. *Cell* 96, 271-290 (1999).
- Eide, E. J. & Virshup, D. M. Casein kinase I: Another cog in the circadian clockworks. *Chronobiology International* 18, 389-398 (2001).
- Field, M. D., Maywood, E. S., O'Brien, J. A., Weaver, D. R., Reppert, S. M. & Hastings, M. H. Analysis of clock proteins in mouse SCN demonstrates phylogenetic divergence of the circadian clockwork and resetting mechanisms. *Neuron* 25, 437-447 (2000).

Ginty, D. D., Kornhauser, J. M., Thompson, M. A., Bading, H., Mayo, K. E., Takahashi, J. S., & Greenberg, M. E. Regulation of CREB phosphorylation in the suprachiasmatic nucleus by light and a circadian clock. *Science* 260, 238-241 (1993).

Gouldsborough, I. & Ashton, N. Influence of milk availability and maternal care on the feeding rate of the spontaneously hypertensive rat (SHR) pup. *Journal of Physiology-London* 499, 64-64 (1997).

Grosse, J. & Davis, F. C. Transient entrainment of a circadian pacemaker during development by dopaminergic activation in Syrian hamsters. *Brain Research Bulletin* 48, 185-194 (1999).

Grosse, J., Velickovic, A. & Davis, F. C. Entrainment of Syrian hamster circadian activity rhythms by neonatal melatonin injections. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 270, 533-540 (1996).

Guo, H. G., Brewer, J. M., Lehman, M. N. & Bittman, E. L. Suprachiasmatic regulation of circadian rhythms of gene expression in hamster peripheral organs: Effects of transplanting the pacemaker. *Journal of Neuroscience* 26, 6406-6412 (2006).

Hakansson, M. L., Brown, H., Ghilardi, N., Skoda, R. C. & Meister, B. Leptin receptor immunoreactivity in chemically defined target neurons of the hypothalamus. *Journal of Neuroscience* 18, 559-572 (1998).

Hara, R., Wan, K. K., Wakamatsu, H., Aida, R., Moriya, T., Akiyama, M. & Shibata, S. Restricted feeding entrains liver clock without participation of the suprachiasmatic nucleus. *Genes to Cells* 6, 269-278 (2001).

Harrington, M. E. The ventral lateral geniculate nucleus and the intergeniculate leaflet: Interrelated structures in the visual and circadian systems. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 21, 705-727 (1997).

Hastings, M. H. Circadian clocks. *Current Biology* 7, R670-R672 (1997).

Hastings, M. H., Duffield, G. E., Smith, E. J. D., Maywood, E. S. & Ebling, F. J. P. Entrainment of the circadian system of mammals by nonphotic cues. *Chronobiology International* 15, 425-445 (1998).

Hastings, M. H. & Herzog, E. D. Clock genes, oscillators, and cellular networks in the suprachiasmatic nuclei. *Journal of Biological Rhythms* 19, 400-413 (2004).

Hiroshige, T., Honma, K. I. & Watanabe, K. Prenatal onset and maternal modifications of the circadian rhythms of plasma-corticosterone in blind infantile rats. *Journal of Physiology-London* 325, 521-532 (1982).

Honma, K., Honma, S., Shirakawa, T. & Hiroshige, T. Phase setting of circadian locomotor rhythm of infant rats. *American Journal of Physiology* 252, 256-261 (1987).

Honma, S., Honma, K., Shirakawa, T. & Hiroshige, T. Maternal phase setting of fetal circadian oscillation underlying the plasma-corticosterone rhythm in rats. *Endocrinology* 114, 1791-1796 (1984).

Illnerová, H. Blížíme se k poznání podstaty biologických hodin?. *Vesmír* 73, 8, 425-426 (1994).

- Illnerova, H., Backstrom, M., Saaf, J., Wetterberg, L. & Vangbo, B. Melatonin in rat pineal-gland and serum – rapid parallel decline after light exposure at night. *Neuroscience Letters* 9, 189-193 (1978).
- Jin, X. W., Shearman, L. P., Weaver, D. R., Zylka, M. J., De Vries, G. J. & Reppert, S. M. A molecular mechanism regulating rhythmic output from the suprachiasmatic circadian clock. *Cell* 96, 57-68 (1999).
- Jud, C. & Albrecht, U. Circadian rhythms in murine pups develop in absence of a functional maternal circadian clock. *Journal of Biological Rhythms* 21, 149-154 (2006).
- Kalsbeek, A. & Buijs, R. M. Output pathways of the mammalian suprachiasmatic nucleus: coding circadian time by transmitter selection and specific targeting. *Cell and Tissue Research* 309, 109-118 (2002).
- Klein, D. C. & Moore, R. Y. Pineal N-acetyltransferase and hydroxyindole-O-methyltransferase – control by retinohypothalamic tract and the suprachiasmatic nucleus. *Brain Research* 174, 245-262 (1979).
- Ko, C. H., & Takahashi, J. S. Molecular components of the mammalian circadian clock. *Human molecular genetics* 15, 271-277 (2006).
- Kornhauser, J. M., Nelson, D. E., Mayo, K. E. & Takahashi, J. S. Photic and circadian regulation of c-fos-gene expression in the hamster suprachiasmatic nucleus. *Neuron* 5, 127-134 (1990).
- Kovacikova, Z., Sladek, M., Bendova, Z., Illnerova, H. & Sumova, A. Expression of clock and clock-driven genes in the rat suprachiasmatic nucleus during late fetal and early postnatal development. *Journal of Biological Rhythms* 21, 140-148 (2006).
- Lamont, E. W., Robinson, B., Stewart, J. & Amir, S. The central and basolateral nuclei of the amygdala exhibit opposite diurnal rhythms of expression of the clock protein Period2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 4180-4184 (2005).
- Leak, R. K., Card, J. P. & Moore, R. Y. Suprachiasmatic pacemaker organization analyzed by viral transynaptic transport. *Brain Research* 819, 23-32 (1999).
- Lee, C., Etchegaray, J. P., Cagampang, F. R. A., Loudon, A. S. I. & Reppert, S. M. Posttranslational mechanisms regulate the mammalian circadian clock. *Cell* 107, 855-867 (2001).
- Liu, C., Weaver, D. R., Strogatz, S. H. & Reppert, S. M. Cellular construction of a circadian clock: Period determination in the suprachiasmatic nuclei. *Cell* 91, 855-860 (1997).
- Lowrey, P. L. & Takahashi, J. S. Mammalian circadian biology: Elucidating genome-wide levels of temporal organization. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 5, 407-441 (2004).
- Mateju, K., Bendova, Z., El-Hennamy, R., Sladek, M., Sosniyenko, S. & Sumova, A. Development of the light sensitivity of the clock genes Period1 and Period2, and immediate-early gene c-fos within the rat suprachiasmatic nucleus. *European Journal of Neuroscience* 29, 490-501 (2009).

- Maywood, E. S., Mrosovsky, N., Field, M. D. & Hastings, M. H. Rapid down-regulation of mammalian Period genes during behavioral resetting of the circadian clock. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 15211-15216 (1999).
- McMillen, I. C. & Nowak, R. Maternal pinealectomy abolishes the diurnal rhythm in plasma melatonin concentrations in the fetal sheep and pregnant ewe during late gestation. *Journal of Endocrinology* 120, 459-464 (1989).
- Michel, S., Itri, J., Han, J. H., Gnietczynski, K. & Colwell, C. S. Regulation of glutamatergic signalling by PACAP in the mammalian suprachiasmatic nucleus. *Bmc Neuroscience* 7 (2006).
- Moller, M. & Baeres, F. M. M. The anatomy and innervation of the mammalian pineal gland. *Cell and Tissue Research* 309, 139-150 (2002).
- Moore, R. Y. & Bernstein, M. E. Synaptogenesis in the rat suprachiasmatic nucleus demonstrated by electron microscopy and synapsin-1 immunoreactivity. *Journal of Neuroscience* 9, 2151-2162 (1989).
- Moore, R. Y. & Card, J. P. Intergeniculate leaflet – an anatomically and functionally distinct subdivision of the lateral geniculate complex. *Journal of Comparative Neurology* 344, 403-430 (1994).
- Novakova, M., Polidarova, L., Sladek, M. & Sumova, A. Restricted feeding regime affects clock gene expression profiles in the suprachiasmatic nucleus of rats exposed to constant light. *Neuroscience* 197, 65-71 (2011).
- Novakova, M., Sladek, M. & Sumova, A. Exposure of Pregnant Rats to Restricted Feeding Schedule Synchronizes the SCN Clocks of Their Fetuses under Constant Light but Not under a Light-Dark Regime. *Journal of Biological Rhythms* 25, 350-360 (2010).
- Obrietan, K., Impey, S. & Storm, D. R. Light and circadian rhythmicity regulate MAP kinase activation in the suprachiasmatic nuclei. *Nature Neuroscience* 1, 693-700 (1998).
- Ohta, H., Honma, S., Abe, H. & Honma, K. Effects of nursing mothers on rPer1 and rPer2 circadian expressions in the neonatal rat suprachiasmatic nuclei vary with developmental stage. *European Journal of Neuroscience* 15, 1953-1960 (2002).
- Ohta, H., Honma, S., Abe, H. & Honma, K. Periodic absence of nursing mothers phase-shifts circadian rhythms of clock genes in the suprachiasmatic nucleus of rat pups. *European Journal of Neuroscience* 17, 1628-1634 (2003).
- Ohta, H., Mitchell, A. C. & McMahon, D. G. Constant light disrupts the developing mouse biological clock. *Pediatric Research* 60, 304-308 (2006).
- Ohta, H., Yamazaki, S. & McMahon, D. G. Constant light desynchronizes mammalian clock neurons. *Nature Neuroscience* 8, 267-269 (2005).
- Okamoto, K., Aoki, K. & Hashimoto, Y. Development of a colony of spontaneously hypertensive rats. *Acta Pathologica Japonica* 11, 249-& (1961).
- Okamura, H., Yamaguchi, S. & Yagita, K. Molecular machinery of the circadian clock in mammals. *Cell and Tissue Research* 309, 47-56 (2002).

- Peters, R. V., Zoeller, R. T., Hennessey, A. C., Stopa, E. G., Anderson, G. & Albers, H. E. The control of circadian rhythms and the levels of vasoactive-intestinal-peptide messenger-RNA in the suprachiasmatic nucleus are altered in spontaneously hypertensive rats. *Brain Research* 639, 217-227 (1994).
- Pittendrigh, C. S. & Daan, S. Functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. *Journal of Comparative Physiology* 106, 223-252 (1976).
- Polidarova, L., Sladek, M., Sotak, M., Pacha, J. & Sumova, A. Hepatic, Duodenal, and Colonic Circadian Clocks Differ in their Persistence under Conditions of Constant Light and in their Entrainment by Restricted Feeding. *Chronobiology International* 28, 204-215 (2011).
- Ralph, M. R., Foster, R. G., Davis, F. C. & Menaker, M. Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science* 247, 975-978 (1990).
- Reppert, S. M., Chez, R. A., Anderson, A. & Klein, D. C. Maternal-fetal transfer of melatonin in the non-human primate. *Pediatric Research* 13, 788-791 (1979).
- Reppert, S. M., Coleman, R. J., Heath, H. W. & Swedlow, J. R. Pineal N-acetyltransferase activity in 10-day-old rats – a paradigm for studying the developing circadian system. *Endocrinology* 115, 918-925 (1984).
- Reppert, S. M., Godson, C., Mahle, C.D., Weaver, D.R., Slaugenhaupt, S.A. & Gusella, J.F. Molecular characterization of a 2nd melatonin receptor expressed in human retina and brain – the MEL (1B) melatonin receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 8734-8738 (1995).
- Reppert, S. M. & Schwartz, W. J. The suprachiasmatic nuclei of the fetal-rat – characterization of a functional circadian clock using C-14-labeled deoxyglucose. *Journal of Neuroscience* 4, 1677-1682 (1984).
- Reppert, S. M. & Schwartz, W. J. Maternal endocrine extirpations do not abolish maternal coordination of the fetal circadian clock. *Endocrinology* 119, 1763-1767 (1986a).
- Reppert, S. M. & Schwartz, W. J. Maternal suprachiasmatic nuclei are necessary for maternal coordination of the developing circadian system. *Journal of Neuroscience* 6, 2724-2729 (1986b).
- Reppert, S. M. & Weaver, D. R. Molecular analysis of mammalian circadian rhythms. *Annual Review of Physiology* 63, 647-676 (2001).
- Ruby, N. F., Brennan, T.J., Xie, X.M., Cao, V., Franken, P., Heller, H.C. & O'Hara, B.F. Role of melanopsin in circadian responses to light. *Science* 298, 2211-2213 (2002).
- Rutter, J., Reick, M. & McKnight, S. L. Metabolism and the control of circadian rhythms. *Annual Review of Biochemistry* 71, 307-331 (2002).
- Sasaki, Y., Murakami, N. & Takahashi, K. Critical period for the entrainment of the circadian rhythm in blinded pups by dams. *Physiology & Behavior* 33, 105-109 (1984).

Sato, T. K., Panda, S., Miraglia, L.J., Reyes, T.M., Rudic, R.D., McNamara, P., Naik, K.A., Fitzgerald, G.A., Kay, S.A. & Hogenesch, J.B. A functional genomics strategy reveals *rora* as a component of the mammalian circadian clock. *Neuron* 43, 527-537 (2004).

Schibler, U. The daily rhythms of genes, cells and organs - Biological clocks and circadian timing in cells. *Embo Reports* 6, 9-13 (2005).

Schibler, U., Ripperger, J. & Brown, S. A. Peripheral circadian oscillators in mammals: Time and food. *Journal of Biological Rhythms* 18, 250-260 (2003).

Schibler, U. & Sassone-Corsi, P. A web of circadian pacemakers. *Cell* 111, 919-922 (2002).

Semo, M., Lupi, D., Peirson, S. N., Butler, J. N. & Foster, R. G. Light-induced *c-fos* in melanopsin retinal ganglion cells of young and aged rodless/coneless (*rd/rd cl*) mice. *European Journal of Neuroscience* 18, 3007-3017 (2003).

Shearman, L. P., Sriram, S., Weaver, D.R., Maywood, E.S., Chaves, I., Zheng, B.H., Kume, K., Lee, C.C., van der Horst, G.T.J., Hastings, M.H. & Reppert, S.M. Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock. *Science* 288, 1013-1019 (2000).

Shibata, S. & Moore, R. Y. Development of neuronal activity in the rat suprachiasmatic nucleus. *Developmental Brain Research* 34, 311-315 (1987).

Shibata, S. & Moore, R. Y. Development of a fetal circadian rhythm after disruption of the maternal circadian system. *Developmental Brain Research* 41, 313-317 (1988).

Shigeyoshi, Y., Taguchi, K., Yamamoto, S., Takekida, S., Yan, L., Tei, H., Moriya, T., Shibata, S., Loros, J.J., Dunlap, J.C. & Okamura H. Light-induced resetting of a mammalian circadian clock is associated with rapid induction of the *mPer1* transcript. *Cell* 91, 1043-1053 (1997).

Shimoda, K., Hanada, K., Yamada, N., Takahashi, K. & Takahashi, S. Periodic exposure to mother is potent zeitgeber of rat pups rhythm. *Physiology & Behavior* 36, 723-730 (1986).

Silver R. & Schwartz W.J. The Suprachiasmatic Nucleus is a Functionally Heterogeneous Timekeeping Organ. *Methods Enzymology* 393, 451-465 (2003).

Sladek, M., Polidarova, L., Novakova, M., Parkanova, D. & Sumova, A. Early Chronotype and Tissue-Specific Alterations of Circadian Clock Function in Spontaneously Hypertensive Rats. *Plos One* 7, 14 (2012).

Sladek, M., Rybova, M., Jindrakova, Z., Zemanova, Z., Polidarova, L., Mrnka, L., O'Neill, J., Pacha, J. & Sumova, A. Insight into the circadian clock within rat colonic epithelial cells. *Gastroenterology* 133, 1240-1249 (2007).

Sladek, M., Sumova, A., Kovacikova, Z., Bendova, Z., Laurinova, K. & Illnerova, H. Insight into molecular core clock mechanism of embryonic and early postnatal rat suprachiasmatic nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 6231-6236 (2004).

Stokkan, K. A., Yamazaki, S., Tei, H., Sakaki, Y. & Menaker, M. Entrainment of the circadian clock in the liver by feeding. *Science* 291, 490-493 (2001).

- Storch, K. F., Lipan, O., Leykin, I., Viswanathan, N., Davis, F. C., Wong, W. H. & Weitz, C. J. Extensive and divergent circadian gene expression in liver and heart. *Nature* 417, 78-83 (2002).
- Sugishita, M., Takashima, M., Takeuchi, Y., Kato, Y., Yamauchi, T. & Takahashi, K. Periodic mother deprivation during the light period reversed the phase of serotonin N-acetyltransferase activity rhythm of the pineal-gland in rat pups. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 46, 609-615 (1993).
- Sumova, A., Bendova, Z., Sladek, M., Kovacikova, Z., El-Hennamy, R., Laurinova, K., Illnerova, H. The rat circadian clockwork and its photoperiodic entrainment during development. *Chronobiology International* 23, 237-243 (2006).
- Sumova, A., Sladek, M., Polidarova, L., Navakova, M. & Houdek, P. Circadian system from conception till adulthood. *Progress in Brain Research* 199, 83-103 (2012).
- Takahashi, K. & Deguchi, T. Entrainment of the circadian rhythms of blinded infant rats by nursing mothers. *Physiology & Behavior* 31, 373-378 (1983).
- Tosini, G., Davidson, A. J., Fukuhara, C., Kasamatsu, M. & Castamon-Cervantes, O. Localization of a circadian clock in mammalian photoreceptors. *Faseb Journal* 21, 3866-3871 (2007).
- Unger, J., McNeill, T.H., Moxley, R.T., White, M., Moss, A. & Livingston, J.N. Distribution of insulin receptor-like immunoreactivity in the rat forebrain. *Neuroscience* 31, 143-157 (1989).
- Usdin, T. B., Bonner, T. I. & Mezey, E. 2 receptors for vasoactive intestinal polypeptide with similar specificity and complementary distributions. *Endocrinology* 135, 2662-2680 (1994).
- van Esseveldt, L. K. E., Lehman, M. N. & Boer, G. J. The suprachiasmatic nucleus and the circadian time-keeping system revisited. *Brain Research Reviews* 33, 34-77 (2000).
- Vandenpol, A. N. The hypothalamic suprachiasmatic nucleus of rat – intrinsic anatomy. *Journal of Comparative Neurology* 191, 661-702 (1980).
- Vandenpol, A. N. Glutamate and GABA presence and action in the suprachiasmatic nucleus. *Journal of Biological Rhythms* 8, 11-15 (1993).
- Viswanathan, N. Maternal entrainment in the circadian activity rhythm of laboratory mouse. *Physiology & Behavior* 68, 157-162 (1999).
- Viswanathan, N., Weaver, D. R., Reppert, S. M. & Davis, F. C. Entrainment of the fetal hamster circadian pacemaker by prenatal injections of the dopamine agonist SKF-38383. *Journal of Neuroscience* 14, 5393-5398 (1994).
- Weaver, D. R. & Reppert, S. M. Periodic feeding of SCN-lesioned pregnant rats entrains the fetal biological clock. *Developmental Brain Research* 46, 291-296 (1989).
- Weaver, D. R. & Reppert, S. M. Definition of the developmental transition from dopaminergic to photic regulation of c-fos gene expression in the rat suprachiasmatic nucleus. *Molecular Brain Research* 33, 136-148 (1995).

Weaver, D. R., Rivkees, S. A. & Reppert, S. M. D1-dopamine receptors activate c-fos expression in the fetal suprachiasmatic nuclei. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 9201-9204 (1992).

Welsh, D. K., Logothetis, D. E., Meister, M. & Reppert, S. M. Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. *Neuron* 14, 697-706 (1995).

Woon, P. Y., Kaisaki, P.J, Braganca, J., Bihoreau, M.T., Levy, J.C., Farrall, M., Gauguier, D. Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like (BMAL1) is associated with susceptibility to hypertension and type 2 diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 14412-14417 (2007).

Yamaguchi, S., Isejima, H., Matsuo, T., Okura, R., Yagita, K., Kobayashi, M. & Okamura, H. Synchronization of cellular clocks in the suprachiasmatic nucleus. *Science* 302, 1408-1412 (2003).

Yamamoto, T., Nakahata, Y., Soma, H., Akashi, M., Mamine, T. & Takumi, T. Transcriptional oscillation of canonical clock genes in mouse peripheral tissues. *Bmc Molecular Biology* 5 (2004).

Yoo, S. H., Yamazaki, S., Lowrey, P. L., Shimomura, K., Ko, C. H., Buhr, E. D., Siepka, S. M., Hong, H. K., Oh, W. J., Yoo, O. J., Menaker, M., Takahashi, J. S. PERIOD2 :: LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 5339-5346 (2004).

Zigman, J. M., Jones, J. E., Lee, C. E., Saper, C. B. & Elmquist, J. K. Expression of ghrelin receptor mRNA in the rat and the mouse brain. *Journal of Comparative Neurology* 494, 528-548 (2006).